Manuale PAXgene® Blood RNA Kit

Versione 2

Il sistema PAXgene Blood RNA è costituito da una provetta per il prelievo ematico (PAXgene Blood RNA Tube) e dal kit per l'estrazione acidonucleica (PAXgene Blood RNA Kit). Il sistema è destinato al prelievo, alla conservazione e al trasporto di campioni di sangue, alla stabilizzazione dell'RNA intracellulare in provetta chiusa nonché all'isolamento e alla purificazione successivi dell'RNA intracellulare da sangue intero. L'RNA purificato con il sistema PAXgene Blood RNA può essere impiegato nei test di diagnostica molecolare basati sulla RT-PCR.
Le caratteristiche di performance del sistema PAXgene Blood RNA indicate in questo manuale sono state stabilite solo per i trascritti genetici FOS e IL1B. E' responsabilità di chi utilizza il prodotto stabilire appropriate caratteristiche di performance del PAXgene Blood RNA Kit per altri trascritti target.

Per uso diagnostico in vitro

 762174

 1051083IT

PreAnalytiX GmbH,

Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon

Produced by QIAGEN GmbH for PreAnalytiX

R1 1051083IT

Aprile 2008

Marchi:

PAXgene™, PreAnalytiX™ (PreAnalytiX GmbH); QIAGEN,QIAcube (QIAGENGroup),BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Hemogard®, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company,

Franklin Lakes, NJ, USA); Eppendorf® (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH).

I kit PAXgene Blood RNA non sono disponibili in tutti i Paesi – si prega di richiedere maggiori informazioni.

PreAnalytiX
PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse
CH – 8634 Hombrechtikon
Svizzera

Distributori PreAnalytiX

I prodotti PreAnalytiX vengono realizzati per PreAnalytiX da QIAGEN o da BD e distribuiti per conto di PreAnalytiX da QIAGEN. I prodotti non possono essere ordinati direttamente presso PreAnalytix GmbH.

Consultare l’ultima pagina del manuale per informazioni sui distributori locali.

Sommario

Spiegazione dei simboli

Simbolo	Significato
<N>	Contenuto sufficiente per <N> test
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Utilizzare entro
	Non riutilizzare
IVD	Dispositivo medico per diagnostica in vitro
REF	Numero di catalogo
LOT	Codice lotto
MAT	Numero di materiale
COMP	Componenti
NUM	Numero
STERILE R	Metodo di sterilizzazione con radiazioni
KU	Unità Kunitz
	Limite di temperatura
	Limite superiore di temperatura
	Fabbricante
	Nota importante
? EtOH	Trascrivere la data corrente dopo aver aggiunto etanolo al flacone
	Al momento della consegna
ADD	Aggiungere
CONT	Contiene
RCNS	Ricostituito
DNase	Desossiribonucleasi I
EtOH	Etanolo
GITC	Guanidina isotiocianato
RNase-Free DNase Set	Set DNasi privo di RNasi
➡	Porta a

Contenuti del kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Catalogo n.			**762174**
Numero delle preparazioni			**50**
BR 1	Tampone di risospensione	RES BUF	20 ml
BR 2	Tampone di legame*	BIND BUF	18 ml
BR 3	Tampone di lavaggio 1*	WASH BUF 1	45 ml
BR 4	Tampone di lavaggio 2† (concentrate)	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Tampone di eluizione	ELU BUF	6 ml
RNFW	Acqua priva di RNasi (flacone)	PEL WASH	2 x 125 ml
PK	Proteinasi K (tappo verde)	PROTK	2 x 1,4 ml
PRC	Spin Columns PAXgene RNA (rosse)	PAXgene RNA COL	5 x 10
PT	Provette di reazione (Processing Tubes) (2 ml)	PROC TUBE	6 x 50
Hemogard	Chiusure secondarie BD Hemogard™	SEC CLOS	50
MCT	Provette per microcentrifuga (1.5 ml)	MIC TUBE	3 x 50 1 x 10
RNFD	DNasi I, priva di RNasi (liofilizzata)	DNA REM	500 Unitá Kunitz ‡

La tabella continua alla pagina seguenre

* Non compatibile con disinfettanti a base di candeggina. Contiene un sale di guanidina. Per le informazioni di sicurezza, consultare pagina 7.

† Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96-100%, grado di purezza p.a. - per analisi), come indicato sul flacone.

‡ Le unità Kunitz vengono normalmente utilizzate per la misurazione della DNasi I; consultare pagina 43 o 49 per la definizione.

PAXgene Blood RNA Kit			**(50)**
Catalogo n.			**762174**
Numero di preparazioni			**50**
RDD	Tampone di digestione DNA (tappo bianco)	DNA DIG BUF	2 x 2 ml
DRB	Tampone di risospensione DNasi (provetta, tappo lilla)	DNase RES BUF	2 ml
PSC	Colonne PAXgene Shredder (lilla)	PAXgene SHRED COL	5 x 10
	PAXgene Blood RNA Kit Handbook (Versione 2)	HB	1

Condizioni di conservazione

Le spin columns PAXgene RNA (PRC), le colonne PAXgene shredder (PSC), nonchè la proteinasi K (PK) e i tamponi (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) possono essere conservati in un luogo asciutto alla temperatura indicata sull'etichetta del kit.

Il set DNasi priva di RNAsi, che contiene DNasi I (RNFD), tampone di digestione del DNA (RDD) e tampone di risospensione della DNasi (DRB) viene fornito a temperatura ambiente. Alla consegna, conservare tutti i componenti del set DNasi priva di RNasi alla temperatura indicata in etichetta.

Uso previsto

Il kit PAXgene Blood RNA è destinato alla purificazione del RNA intracellulare da sangue intero, raccolto nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Usando il kit in combinazione con la PAXgene Blood RNA Tube il sistema fornisce RNA intracellulare purificato da sangue intero umano per i test di diagnostica clinica molecolare basati sulla RT PCR. Informazioni sull'impiego delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) si possono trovare nella descrizione del prodotto per le PAXgene Blood RNA Tubes.

Le caratteristiche di performance del sistema PAXgene Blood RNA indicate in questo manuale valgono per i trascritti genetici FOS e IL1B. E' responsabilità di chi utilizza il prodotto stabilire per il sistema PAXgene Blood RNA relative caratteristiche di performance per altri trascritti target.

Limitazioni all'uso del prodotto

Il kit PAXgene Blood RNA è concepito per la purificazione dell'RNA intracellulare da sangue intero umano (4,8 x 106 – 1,1 x 107 leucociti/ml) per applicazioni di diagnostica in vitro. Non è destinato alla purificazione del DNA genomico o di acidi nucleici virali da sangue intero umano. Poiché solo un numero limitato di trascritti RNA è stato validato per le condizioni di stabilizzazione indicate in questo manuale (trascritti FOS e IL1B), non può essere stabilita una caratteristica di performance per tutti i trascritti. E' responsabilità di chi utilizza il kit verificare i propri dati e quelli del produttore e decidere se è necessaria una validazione per altri trascritti non indicati in questo manuale.

Controllo di qualità

In conformità al sistema di gestione della qualità secondo le norme ISO di QIAGEN, ogni lotto del kit PAXgene Blood RNA viene testato in base a criteri di controllo prestabiliti, rispetto a specifiche prestabilite, per garantire la costante qualità del prodotto.

Supporto tecnico

Ai suoi clienti QIAGEN garantisce la qualità della consulenza scientifica del proprio supporto tecnico. Personale qualificato e di grande esperienza nel settore della biologia molecolare è a vostra disposizione per qualsiasi domanda riguardante i prodotti PreAnalytix. In caso di dubbi sul kit PAXgene Blood RNA non esitate a contattarci.

Anche per ulteriori informazioni il supporto tecnico di QIAGEN (vedi pag. 63) è a vostra disposizione..

Informazioni di sicurezza

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione.

Per ridurre il rischio di infezione (ad es. da HIV o dai virus dell'epatite B) o lesioni, quando si opera con materiali biologici o sostanze chimiche, indossare sempre un adeguato camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per ulteriori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (material safety data sheets, MSDS). Le schede MSDS sono disponibili on-line, nel comodo e compatto formato PDF, all'indirizzo
www.preanalytix.com/rna_msds.asp, dove si possono reperire, visualizzare e stampare le schede di sicurezza per il presente kit e per ogni suo componente.

Il tampone di legame (BR2) e quello di lavaggio 1 (BR3) contengono guanidina tiocianato, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina. Se si rovescia liquido contenente questi tamponi, pulire con un idoneo detergente da laboratorio con acqua. Se il liquido contiene agenti potenzialmente infettivi, innanzitutto pulire l'area interessata con acqua e detergente da laboratorio, e successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v).

ATTENZIONE NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente ai residui delle preparazioni dei campioni di RNA.

La soluzione di stabilizzazione per l'RNA e il sangue contenuto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) possono essere disinfettati utilizzando 1 volume di una soluzione di candeggina disponibile in commercio (ipoclorito di sodio al 5%) per 9 volumi di soluzione di stabilizzazione per l'RNA e di sangue.

I residui della preparazione del campione, ad es. i sovranatanti provenienti dalle fasi di centrifugazione delle procedure di purificazione dell'RNA, devono essere considerati sempre potenzialmente infettivi. Per questo devono essere autoclavati o inceneriti per distruggere qualsiasi materiale infettivo. Lo smaltimento deve essere effettuato in conformità alle normative ufficiali vigenti.

Ai componenti del kit PAXgene Blood RNA si applicano frasi di rischio e i consigli di prudenza (frasi R e S) di seguito riportate: per le informazioni di sicurezza sulle PAXgene blood RNA Tubes consultare la descrizione del prodotto relativa.

Tampone di legame (BR2)

 Xn

Contiene guanidina tiocianato: nocivo (Xn). Frasi di rischio e consigli di prudenza:* R20/21/22-32, S13-26-36-46

Tampone di lavaggio 1 (BR3)

Contiene etanolo : infiammabile. Frase di rischio:* R10

* R10: Infiammabile; R20/21/22: Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e se ingerito; R32: In contatto con acidi libera gas estremamente tossici; R36/37/38: Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle; R42/43: Può provocare sensibilizzazione per inalazione e contatto con la pelle; S13: Conservare lontano da cibi, bevande e alimenti per animali; S22: Non respirare le polveri; S23: Non respirare gli aerosol; S24: Evitare il contatto con la pelle; S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico; S36: Indossare indumenti protettivi adatti; S36/37: Indossare indumenti protettivi adatti e guanti; S46: In caso di ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta.

Proteinasi K (PK)

 Xn

Contiene proteinasi K (*Tritirachium album*): sensibilizzante, irritante. Frasi di rischio e consigli di prudenza:* R36/37/38-42/43, S23-24-26-36/37

DNasi I

 Xn

Contiene desossiribonucleasi (bovina): sensibilizzante. Frasi di rischio e consigli di prudenza:* R42/43, S22-24-26-36/37

Informazioni di emergenza 24 ore su 24

È possibile ottenere informazioni mediche di emergenza in inglese, francese e tedesco, 24 ore su 24, presso:

Centro di informazioni antiveleni, Magonza, Germania

Tel: +49-6131-19240

* R10: Infiammabile; R20/21/22: Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e se ingerito; R32: In contatto con acidi libera gas estremamente tossici; R36/37/38: Irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle; R42/43: Può provocare sensibilizzazione per inalazione e contatto con la pelle; S13: Conservare lontano da cibi, bevande e alimenti per animali; S22: Non respirare le polveri; S23: Non respirare gli aerosol; S24: Evitare il contatto con la pelle; S26: In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico; S36: Indossare indumenti protettivi adatti; S36/37: Indossare indumenti protettivi adatti e guanti; S46: In caso di ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta.

Introduzione

La raccolta del sangue intero è la prima fase di molti test molecolari utilizzati per lo studio dell'RNA cellulare. Tuttavia, uno dei problemi principali in questi casi è l'instabilità del profilo dell'RNA cellulare in vitro. Studi effettuati da PreAnalitiX hanno mostrato che il numero di copie delle singole specie di mRNA nel sangue intero può variare di oltre 1000 volte durante la conservazione e il trasporto a temperatura ambiente.* Ciò è provocato dalla rapida degradazione dell'RNA e dall'espressione indotta di alcuni geni dopo il prelievo ematico. Tali modifiche nel profilo dell'RNA impediscono di effettuare studi attendibili sull'espressione genica. Per un'analisi accurata dell'espressione genica nel sangue intero umano è quindi essenziale un metodo per conservare il profilo di espressione dell'RNA durante e dopo la flebotomia.

Principio PAXgene e sua applicazione

PreAnalytiX ha sviluppato un nuovo sistema che consente il prelievo, la stabilizzazione, la conservazione e il trasporto di campioni di sangue intero umano nonché un rapido ed efficiente protocollo per la purificazione dell'RNA intracellulare. Il sistema comprende le PAXgene Blood RNA Tubes(BRT; brevetti USA 6,602,718 e 6,617,170), per il prelievo ematico e la contemporanea stabilizzazione dell'RNA, e il kit PAXgene Blood RNA per la successiva purificazione dell'RNA manuale o in automatico. Entrambi i protocolli, manuale e in automatico, forniscono sostanzialmente un'analoga performance per quanto riguarda la qualità e la resa dell'RNA. I dati di performance per il protocollo manuale (pagine 19–26) e il protocollo in automatico (pagine 27–30) sono incluse in questo manuale.

Prelievo e stabilizzazione del campione

Le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contengono un reagente basato su una tecnologia di stabilizzazione dell'RNA coperta da brevetto. Questa composizione di reagenti protegge le molecole dalla degradazione causata dalla RNAsi e minimizza i cambiamenti ex-vivo nell'espresione genica. Le PAXgene Blood RNA Tubes per il prelievo da sangue umano intero garantiscono la stabilizzazione dell'RNA cellulare fino a 3 giorni a 18–25 °C (vedi Fig. 1 e 2, pag. 12 e 13) o fino a 5 giorni a 2-8 °C (vedi Fig. 3 e 4, pag. 14 e 15). I dati attualmente disponibili mostrano che a -20 °C o –70 °C l'RNA cellulare rimane stabile per almeno 24 mesi. Per ulteriori informazioni su periodi di stabilizzazione piú lunghi contattare il supporto tecnico QIAGEN.

* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. 48, 1883.

La durata reale della stabilizzazione dell'RNA può variare in base alla specie di RNA cellulare e dall’applicazione downstream. A causa del numero limitato di trascritti validati per le specifiche di stabilizzazione (trascritti genetici FOS e IL 1B), le caratteristiche di performance del kit non sono state definite per tutti i trascritti. E’ compito di chi utilizza il prodotto verificare se per altri trascritti sia necessaria una validazione.

Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 18–25°C: FOS

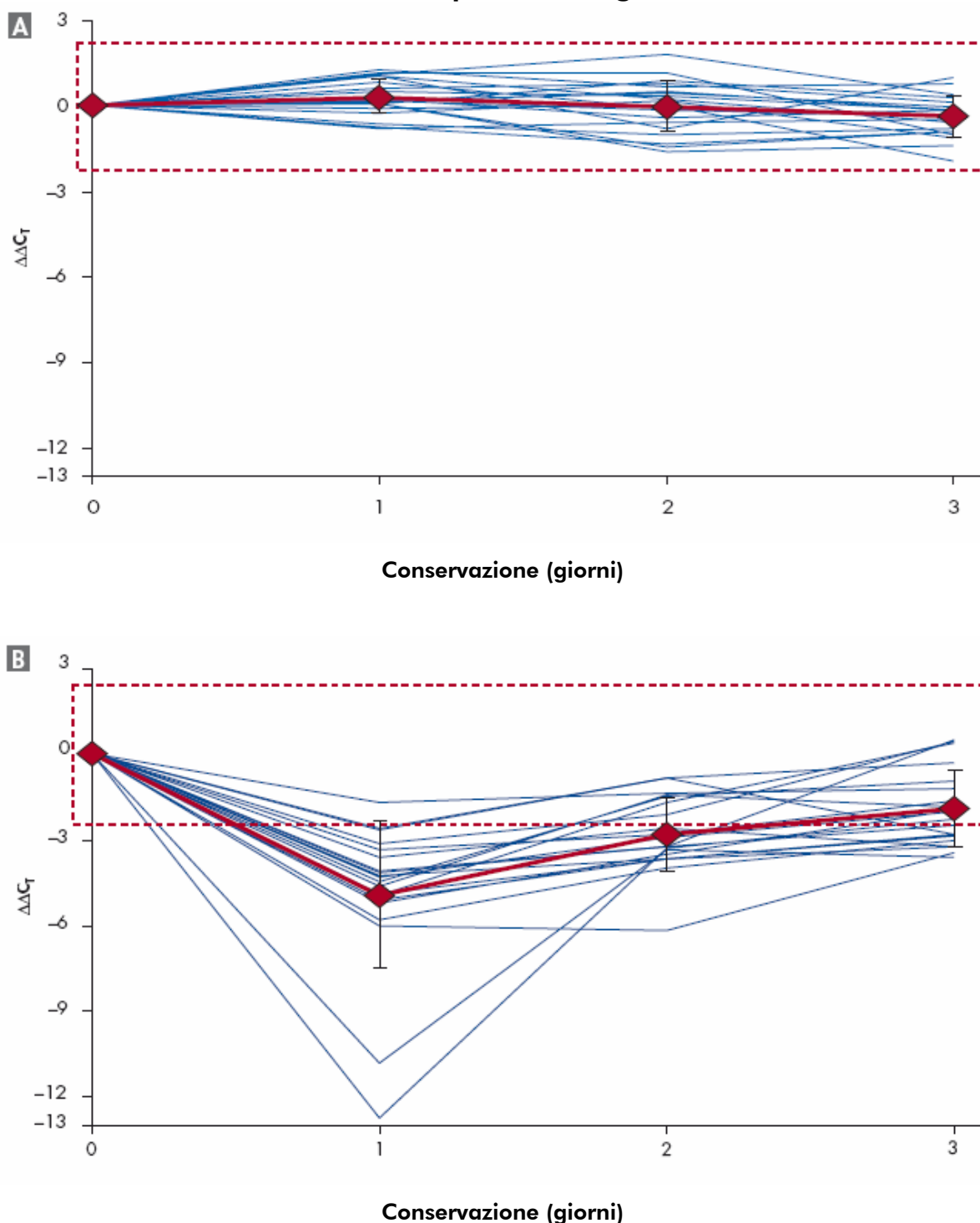



Figura 1 Il sangue è stato prelevato da 10 donatori, con campioni in duplicato, e conservato a 18-25°C per il numero di giorni indicato. Quindi è stata eseguita la purificazione dell'RNA totale. **A** Il sangue è stato prelevato e conservato nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e l'RNA totale è stato purificato utilizzando il kit PAXgene Blood RNA. **B** Il sangue e' stato raccolto e conservato in provette standard contenenti EDTA come sostanza anticoaugulante e l'RNA totale è stato purificato utilizzando un metodo standard di estrazione organica e con purificazione basata su membrane di silice.I livelli relativi di trascrizione del gene FOS sono stati determinati mediante RT-PCR duplex in tempo reale, utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale ±3x del test (2,34 CT).

Stabilità dell'RNA in campioni di sangue a 18–25°C: IL 1B

Conservazione (giorni)

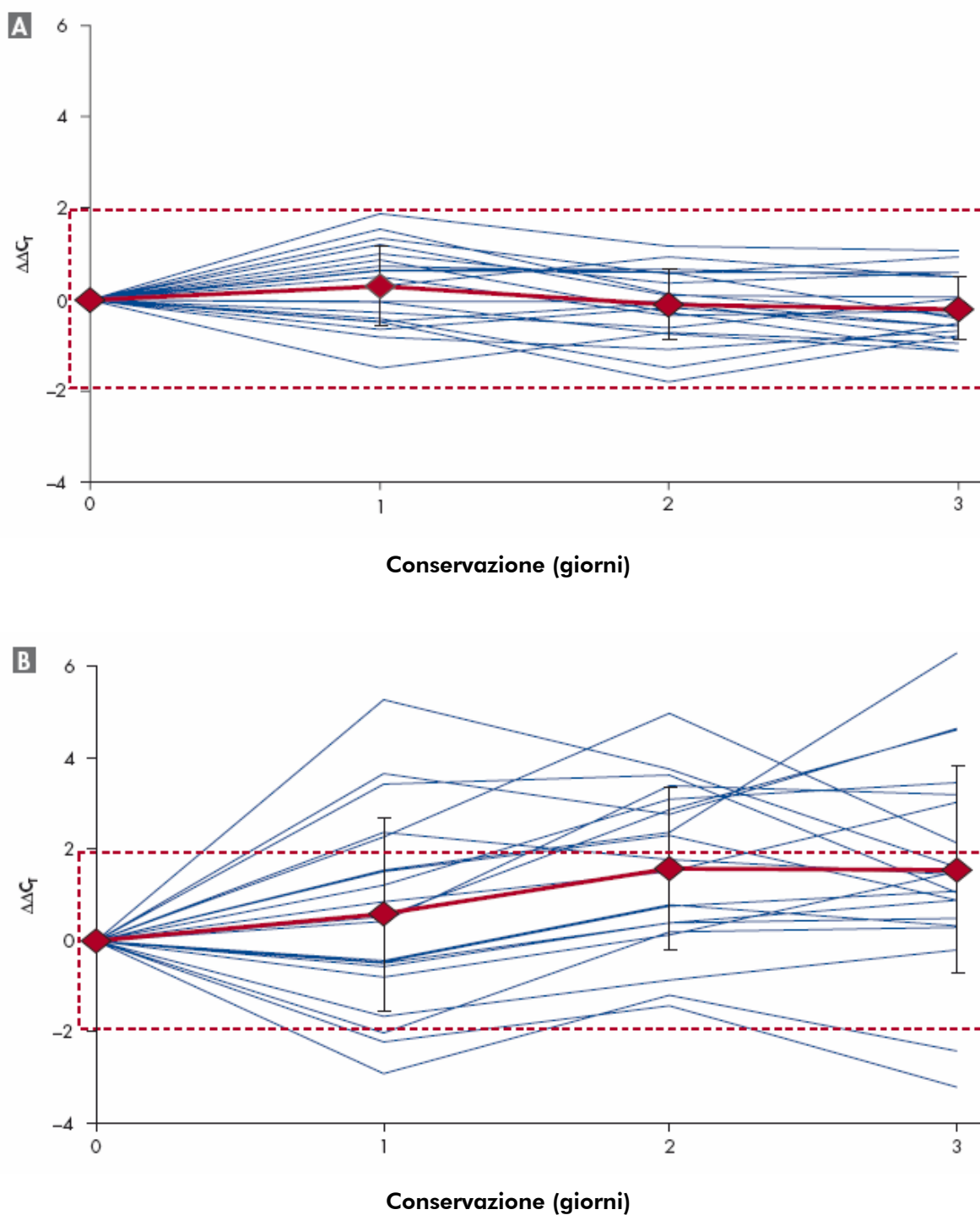



Figura 2 Il prelievo del sangue e la purificazione dell'RNA sono avvenuti, dopo conservazione a 18–25°C, come descritto nella Figura 1. I livelli relativi di trascrizione di IL 1B sono stati determinati mediante real time RT PCR duplex, utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale ±3x del test (1,93 CT).

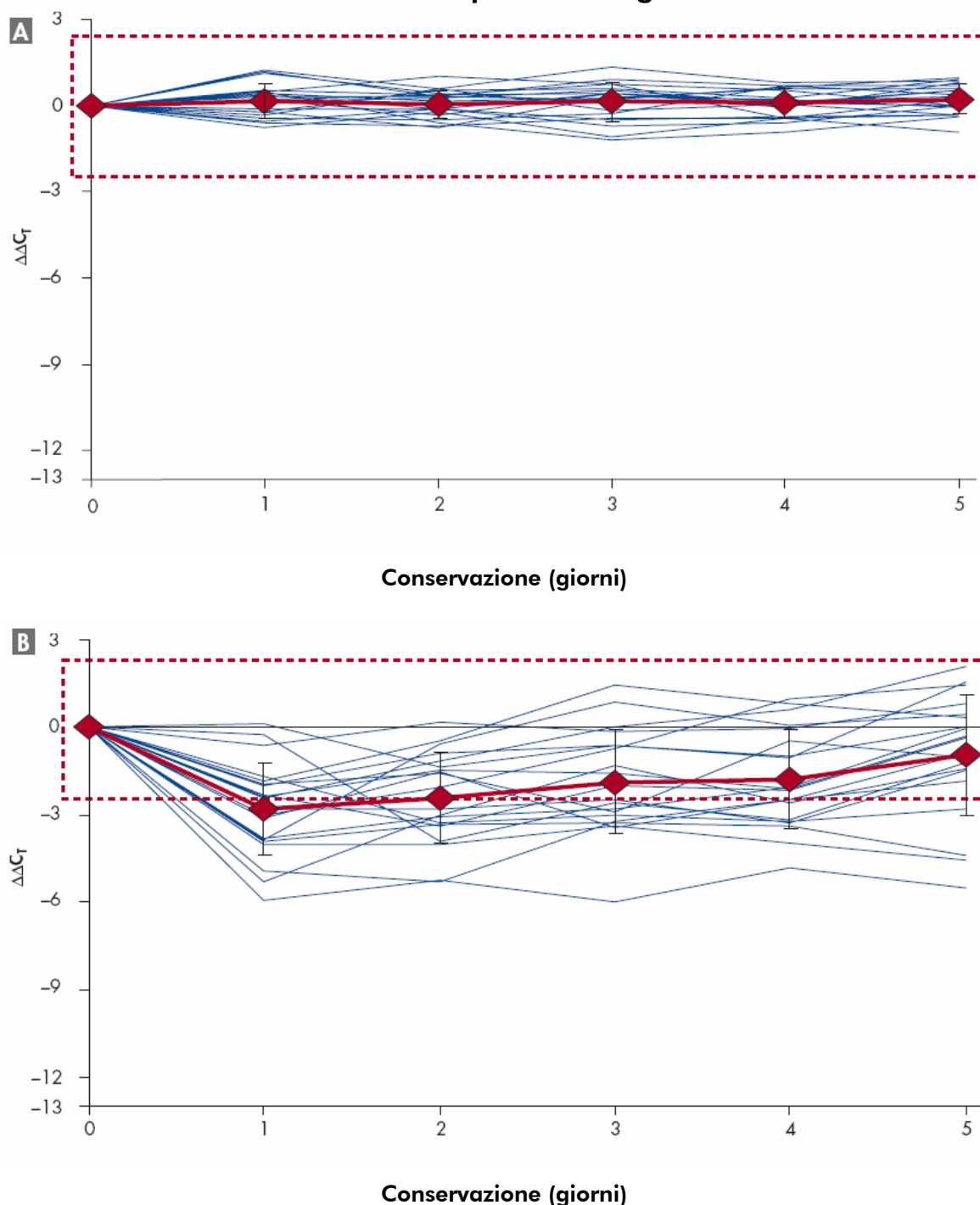
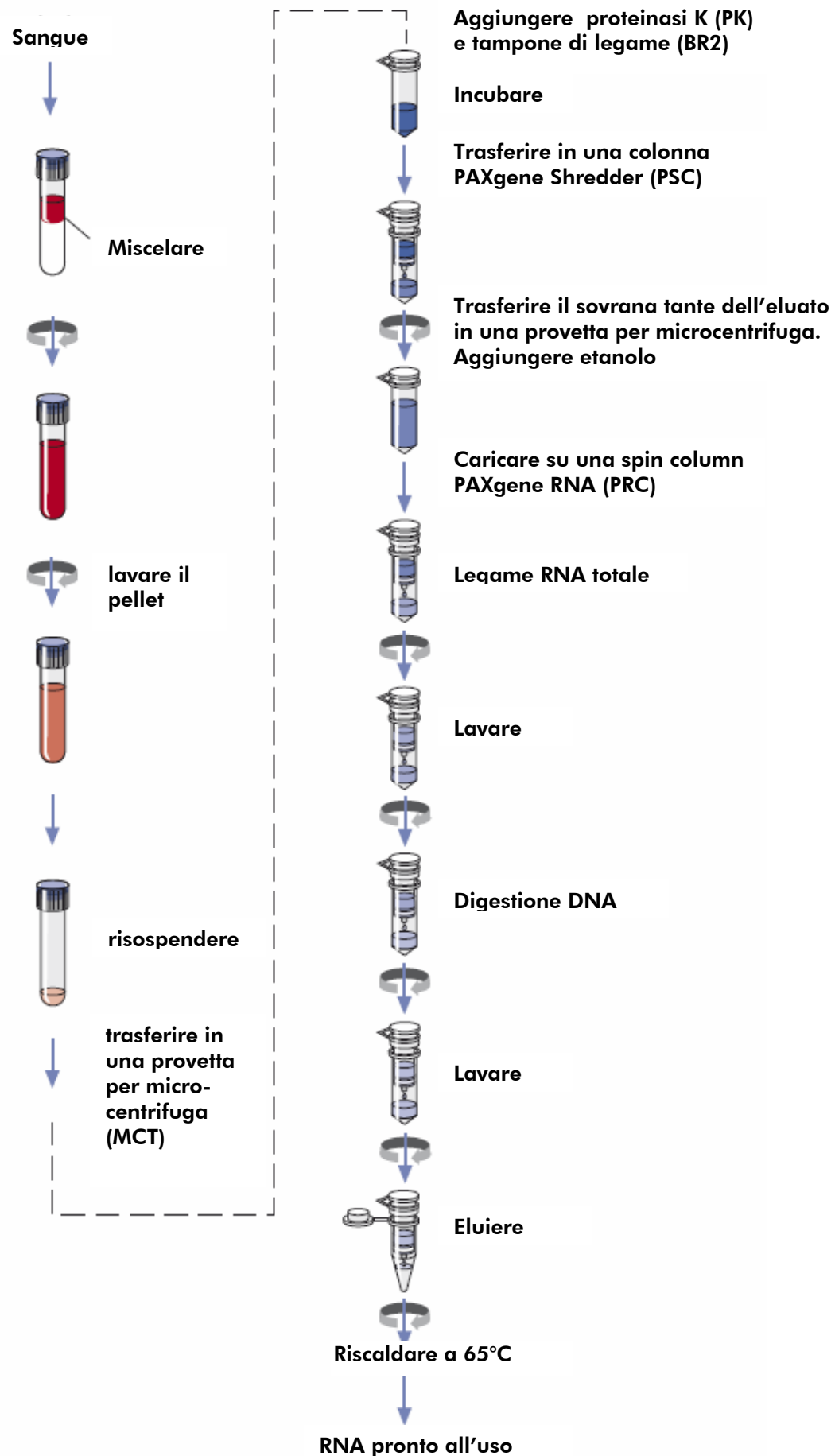
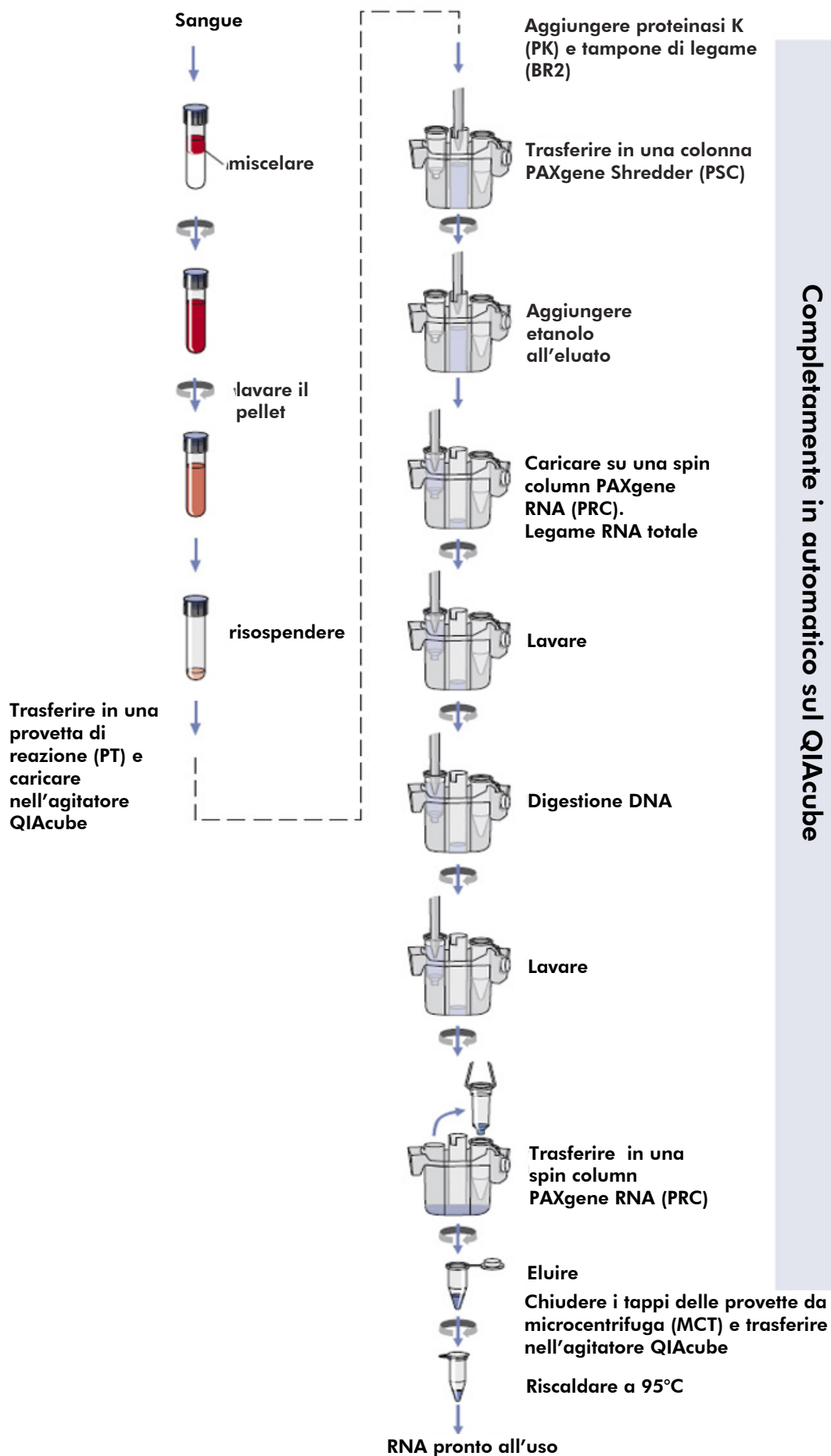



Figura 3 Il sangue è stato prelevato da 10 donatori, con campioni in duplicato, e conservato a 2-8°C per il numero di giorni indicato. Quindi è stata eseguita la purificazione dell'RNA totale. Il sangue è stato prelevato e conservato nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e l'RNA totale purificato con il kit PAXgene Blood RNA. Il sangue è stato prelevato e conservato in provette standard per il prelievo ematico trattate con EDTA come anticoagulante. L'RNA totale è stato purificato utilizzando un metodo standard di estrazione organica con purificazione basata su membrane di silice. I livelli relativi di trascrizione del gene FOS sono stati determinati mediante real time RT PCR duplex utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale ±3x del test (2,34 CT).

Figura 4 Il prelievo del sangue e la purificazione dell'RNA sono avvenuti, dopo conservazione a 2–8°C, come descritto nella Figura 3. I livelli relativi di trascrizione di IL 1B sono stati determinati mediante real time RT PCR duplex utilizzando l'rRNA 18S come standard interno. Nel grafico sono riportati i valori per tutti i campioni analizzati, con le medie e le deviazioni standard. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale ±3x del test (1,93 CT).

Concentrazione e purificazione dell'RNA

Il PAXgene Blood RNA Kit è destinato alla purificazione dell'RNA totale da 2,5 ml di sangue intero umano raccolto in una PAXgene Blood RNA Tube (BRT). La procedura è semplice e può essere realizzata in automatico o manualmente (vedi diagramma). In entrambi i protocolli, la purificazione inizia con una fase di centrifugazioni per pellettare gli acidi nucleici nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Il pellet viene lavato e risospeso e segue poi la purificazione manuale e o in automatico. Di massima, i due protocolli seguono le stesse fasi del protocollo con gli stessi componenti del kit.

La procedura PAXgene Blood RNA manuale

La procedura PAXgene Blood RNA in automatico

Purificazione dell'RNA manuale

Dettagliatamente: il pellet risospeso viene incubato in tamponi con proteinasi K(PK) per la digestione delle proteine. Per omogeneizzare il lisato cellulare e rimuovere i detriti cellulari, si effettua una centrifugazione aggiuntiva utilizzando la colonna PAXgene Shredder (PSC). Il sovranatante dell'eluato viene trasferito in una microprovetta per centrifuga pulita. Per ottimizzare le condizioni di legame si aggiunge etanolo, quindi il lisato viene introdotto nella spin column PAXgene RNA (PRC). Con una breve centrifugazione l'RNA si lega selettivamente alla membrana in silice PAXgene mentre i contaminanti vengono eliminati. Eventuali altri contaminanti vengono rimossi nelle successive ed efficienti fasi di lavaggio. Fra la prima e la seconda fase di lavaggio la membrana viene incubata con DNasi I (RNFD) per eliminare qualsiasi traccia di DNA legato. Dopo le fasi di lavaggio l'RNA viene eluito nel tampone di eluizione (BR5) e denaturato al caldo.

L'RNA totale purificato usando il sistema PAXgene Blood RNA è estremamente puro. Usando il protocollo manuale i valori A260/A280 sono tra 1,8 e 2,2, e ≤1% (w/w) di DNA genomico è presente in ≥95% di tutti i campioni, come misurato da PCR quantitativa in tempo reale di una sequenza del gene beta-actin. Almeno il 95% dei campioni non mostra inibizioni nella RT-PCR, se usato più del 30% dell'eluato.

Usando il protocollo manuale il tempo medio di preparazione dei campioni (in base ai dati da 12 preparazioni) è circa 90 minuti, con soli 40 minuti di passaggi manuali. La resa di RNA da 2,5 ml di sangue intero umano da donatori sani è ≥3 μg per ≥95% dei campioni elaborati. Le rese sono in ogni caso strettamente legate allo stato di salute del donatore e possono variare da un individuo all'altro. Per le analisi di singoli donatori il sistema PAXgene Blood RNA fornisce rese riproducibili e ripetibili (vedi Fig. 5 e 6 alle pag. 20 e 21) e risultati per la RT-PCR riproducibili e ripetibili (vedi Fig. 7 e 8 alle pag. 24 e 25), dimostrandosi quindi l'ideale per i test di diagnostica clinica.

La figura 5 mostra la riproducibilità e la ripetibilità del PAXgene Blood RNA-System. In ulteriori esperimenti sono stati esaminati sia lotti diversi del kit PAXgene Blood RNA, sia quanto l'esecutore dei test influisce sulla riproducibilità della resa di RNA e dei risultati per la Real-Time-RT-PCR. Poiché per queste analisi sono stati utilizzati campioni di sangue analizzati in pool - anziché campioni raccolti singolarmente con le Paxgene Blood RNA-Tubes (BRT) – i risultati di tali esperimenti non rispecchiano la precisione della ripetibilità del sistema, che tiene conto anche delle differenze nel prelievo del sangue, ma solamente la precisione della ripetibilità nella preparazione dell'RNA (vedi Fig. 6).

Purificazione dell'RNA riproducibile e ripetibile

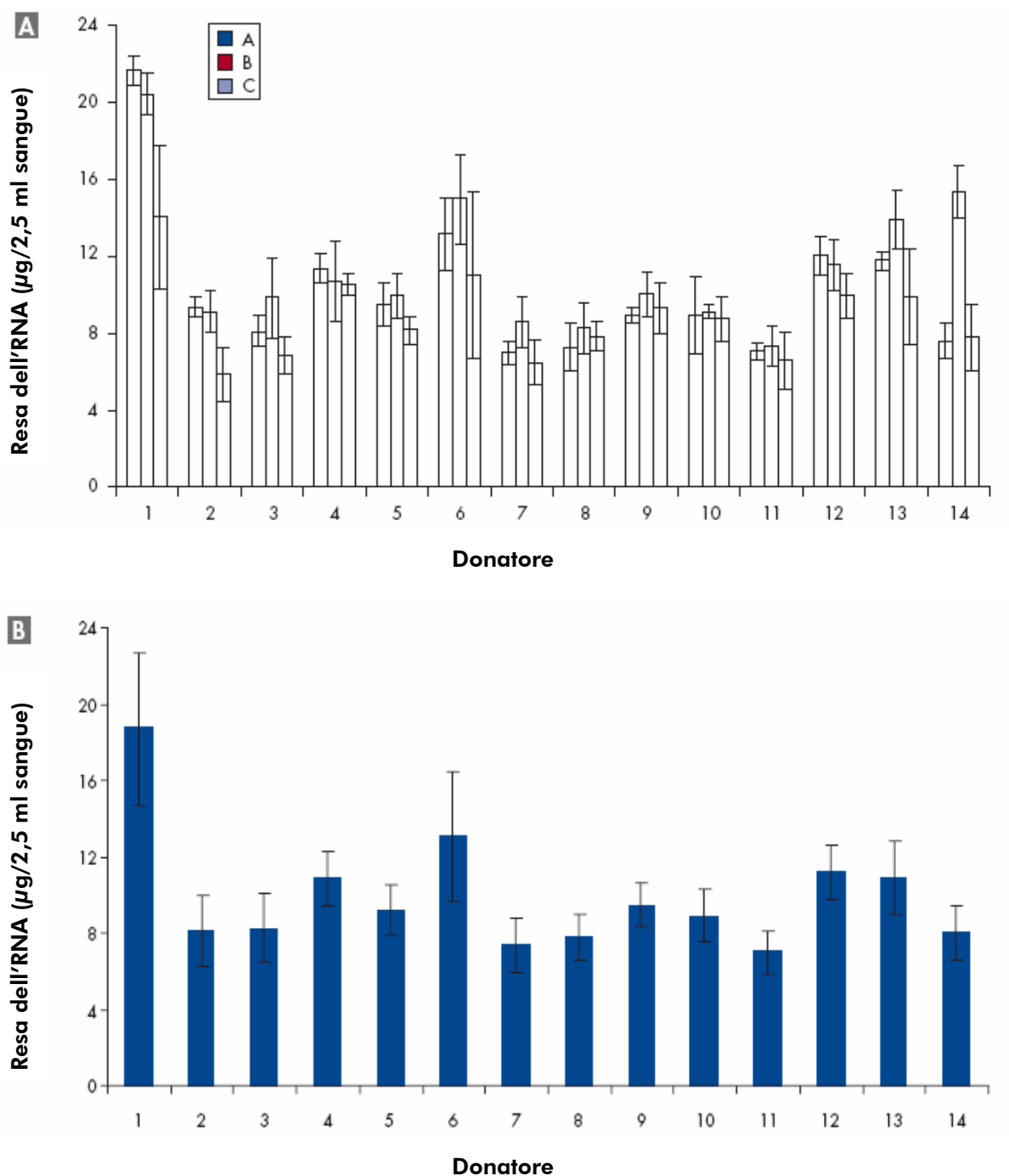



Figura 5 Campioni di sangue sono stati analizzati manualmente in quadruplicato da 3 tecnici (A, B, C). Sono stati utilizzati tre set di strumenti di laboratorio e tutti i campioni preparati da un tecnico sono stati elaborati con gli stessi strumenti. **A** Sono rappresentate medie e deviazioni standard della resa di RNA per campioni replicati dello stesso donatore e con tecnici diversi. **B** Dodici campioni di sangue in replica da ciascuno dei 14 donatori sono stati elaborati da 3 tecnici diversi. Sono rappresentate medie e deviazioni standard della resa di RNA per campioni dello stesso donatore e con tutti i tecnici. Per tutti i campioni di RNA, il rapporto, A_{260}/A_{280} variava tra 1,8 to 2,2.

Ripetibilità e riproducibilità della resa di RNA con differenti esecutori e diversi lotti di PAXgene Blood RNA Kit impiegando campioni di sangue in pool

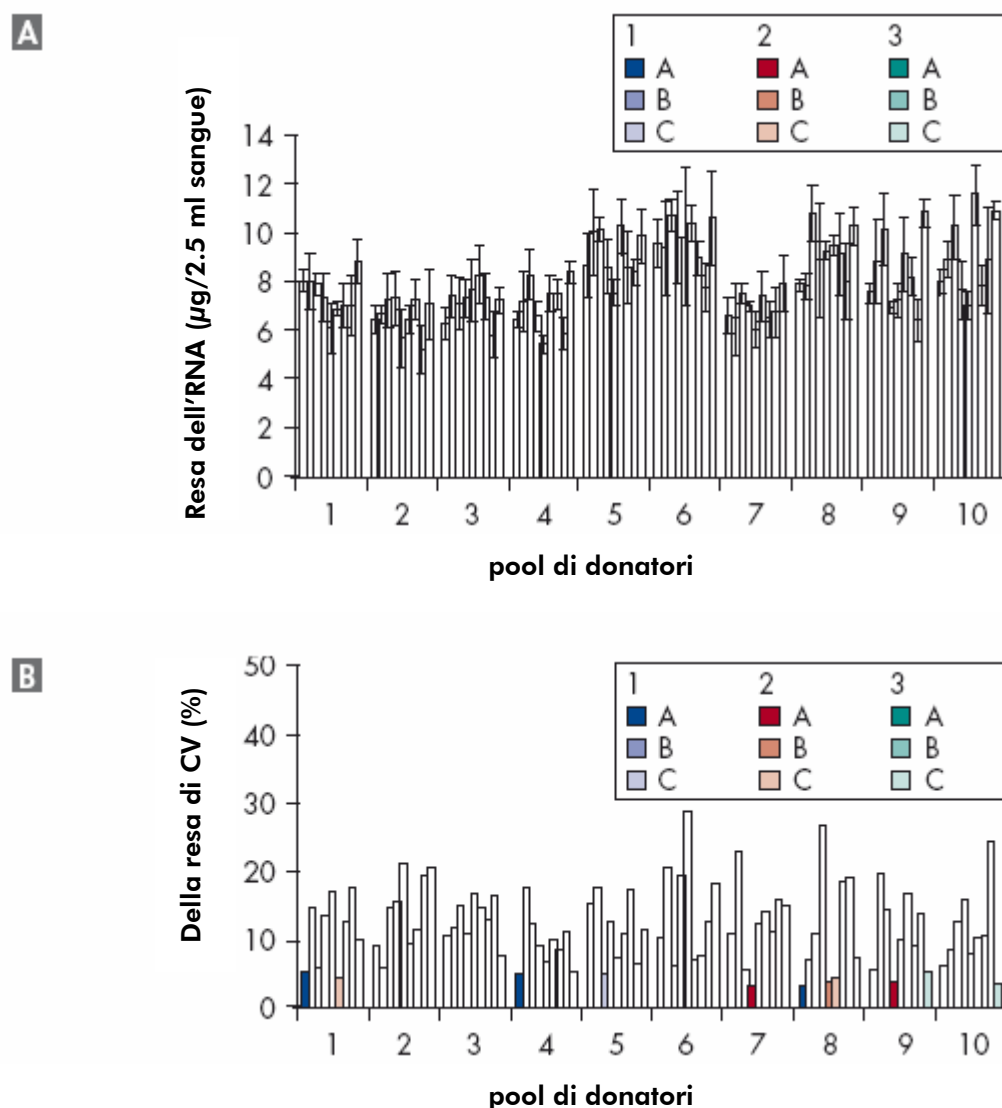



Figura 6 Da 30 donatori sono stati raccolti campioni di sangue nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) (12 provette per donatore, in tutto 360 provette). Il contenuto di tutte le provette dei tre donatori è stato costituito in pool e di seguito aliquotato in 36 campioni. Questi 36 campioni per ogni pool di 3 donatori sono stati analizzati manualmente da tre diversi tecnici. Ogni tecnico ha utilizzato il kit PAXgene Blood RNA da tre diversi lotti per l'isolamento dell'RNA e da quadruplicati già processati da ognuno dei dieci pool. **A** Resa dell'RNA e deviazione standard per ogni combinazione lotto-esecutore. I campioni di sangue di 10 pool di donatori sono stati processati da tre diversi tecnici (A,B e C) con ognuno dei tre lotti di kit (1, 2 e 3). Sono riportate le rese medie (colonne) e le deviazioni standard (barre di errore) per quadruplicato di campione dello stesso pool di donatori per diversi tecnici e lotti di kit. **B** Coefficiente di variazione (CV) della resa di RNA per pool di donatori per tutte le combinazioni tecnico-lotto (A, B e C; 1, 2 e 3), come calcolato dalle rese medie e dalle deviazioni standard in figura 6A.

Tabella 1A. Riproducibilità all' interno di ogni lotto e per ogni tecnico

	Pool di donatori 1 5,1 x 10^6 cellule/ml			Pool di donatori 6 6,5 x 10^6 cellule/ml			Pool di donatori 9 8,4 x 10^6 cellule/ml			Pool di donatori 10 10,2 x 10^6 cellule/ml		
Combinazione di dati	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**
Lotto 1, tecnico A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lotto 1, tecnico B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lotto 1, tecnico C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lotto 2, tecnico A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lotto 2, tecnico B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lotto 2, tecnico A	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lotto 3, tecnico A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lotto 3, tecnico B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lotto 3, tecnico C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabella 1B. Riproducibilità tra tutti i lotti per ogni tecnico

	Pool di donatori 1 5,1 x 10^6 cellule/ml			Pool di donatori 6 6,5 x 10^6 cellule/ml			Pool di donatori 9 8,4 x 10^6 cellule/ml			Pool di donatori 10 10,2 x 10^6 cellule/ml		
Combinazione di dati	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**
Tecnico B, tutti i lotti	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Tecnico B, tutti i lotti	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Tecnico B, tutti i lotti	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabella 1C. Riproducibilitá all'interno di ogni lotto e tra tutti tecnici

	Pool di donatori 1 $5,1 \times 10^6$ cellule /ml			Pool di donatori 6 $6,5 \times 10^6$ cellule /ml			Pool di donatori 9 $8,4 \times 10^6$ cellule /ml			Pool di donatori 10 $10,2 \times 10^6$ cellule /ml		
Combinazione di dati	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**
Lotto 1, tutti i tecnici	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lotto 2, tutti i tecnici	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lotto 3, tutti i tecnici	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabella 1D. Riproducibilità tra tutti i lotti e tra tutti i tecnici.

	Pool di donatori 1 5.1×10^6 cellule /ml			Pool di donatori 6 6.5×10^6 cellule /ml			Pool di donatori 9 8.4×10^6 cellule /ml			Pool di donatori 10 10.2×10^6 cellule /ml		
Combinazione di dati	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**	**Resa media (µg)**	**SD (µg)**	**CV (%)**
Tutti I lotti e tutti I tecnici	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Analisi dettagliata di 4 pool di donatori. I pool sono stati scelti in base al numero di leucociti e indicano il valore superiore, medio e inferiore del normale range di numero di leucociti ($4,8 \times 10^6$- $1,1 \times 10^7$ leucociti/ml). I numeri di leucociti sono stati determinati dalla media dei numeri di leucociti dei 3 donatori di ogni pool.

Riproducibilità della RT-PCR — tra tecnici

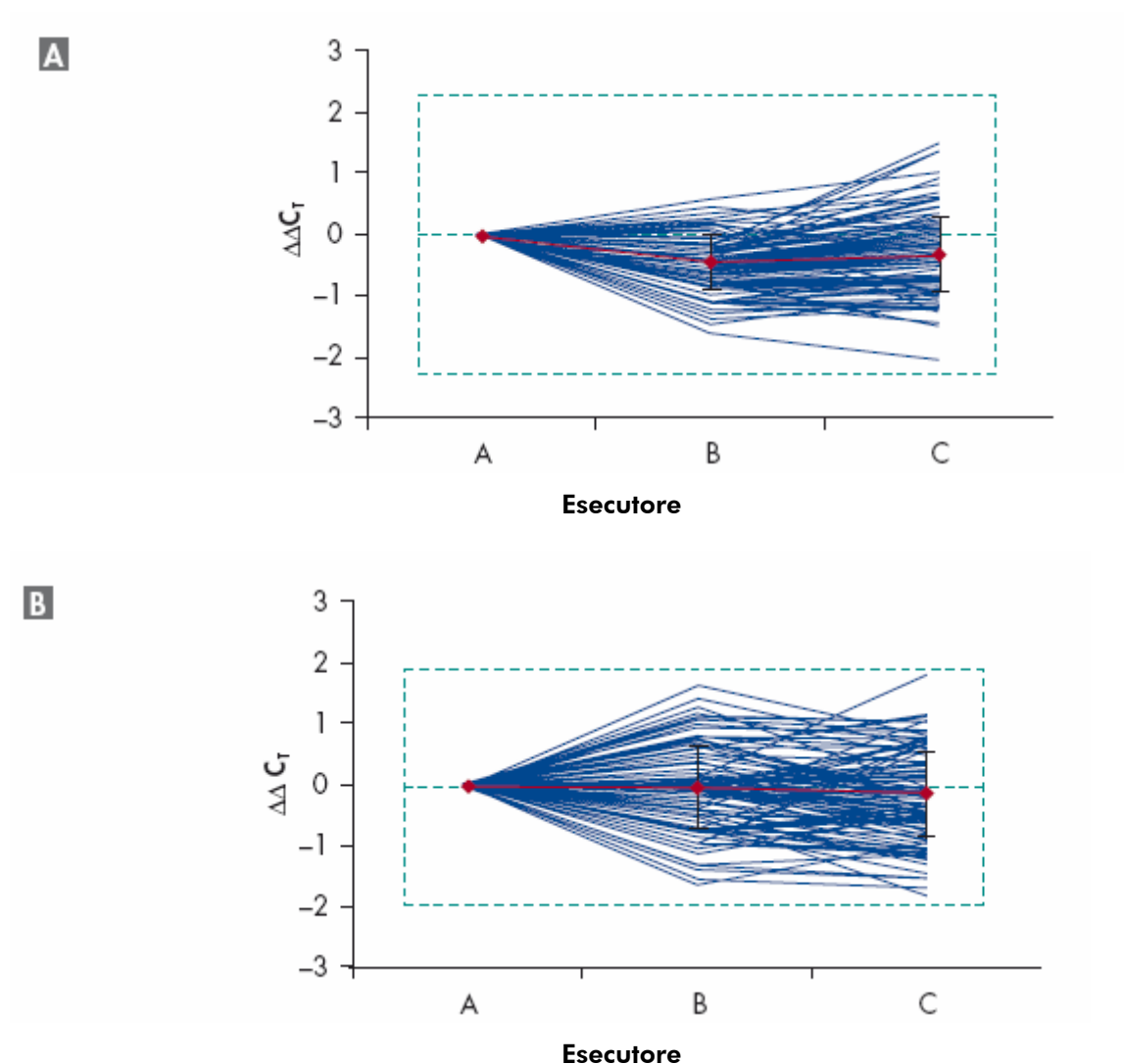



Figura 7 I campioni di RNA isolati nell'esperimento della figura 6 sono stati impiegati in esperimenti di real-time RT PCR. I relativi livelli di trascrizione **A** FOS e **B** sono stati determinati tramite real-time RT PCR duplex impiegando rRNA 18S come standard interno. Sono riportati i valori di tutti i campioni, relativamente ai valori per l'esecutore 1 (10 pool di donatori x 3 lotti x 4 ripetizioni = 120 set di dati per ogni gene) con valore medio (linee rosse) e deviazione standard (barre nere). Le linee tratteggiate indicano il range della precisione degli assay (±3x precisione totale di ± 2,34 C_t (FOS) e ± 1,93 C_t (IL1B).

Riproducibilità della RT-PCR — tra lotti

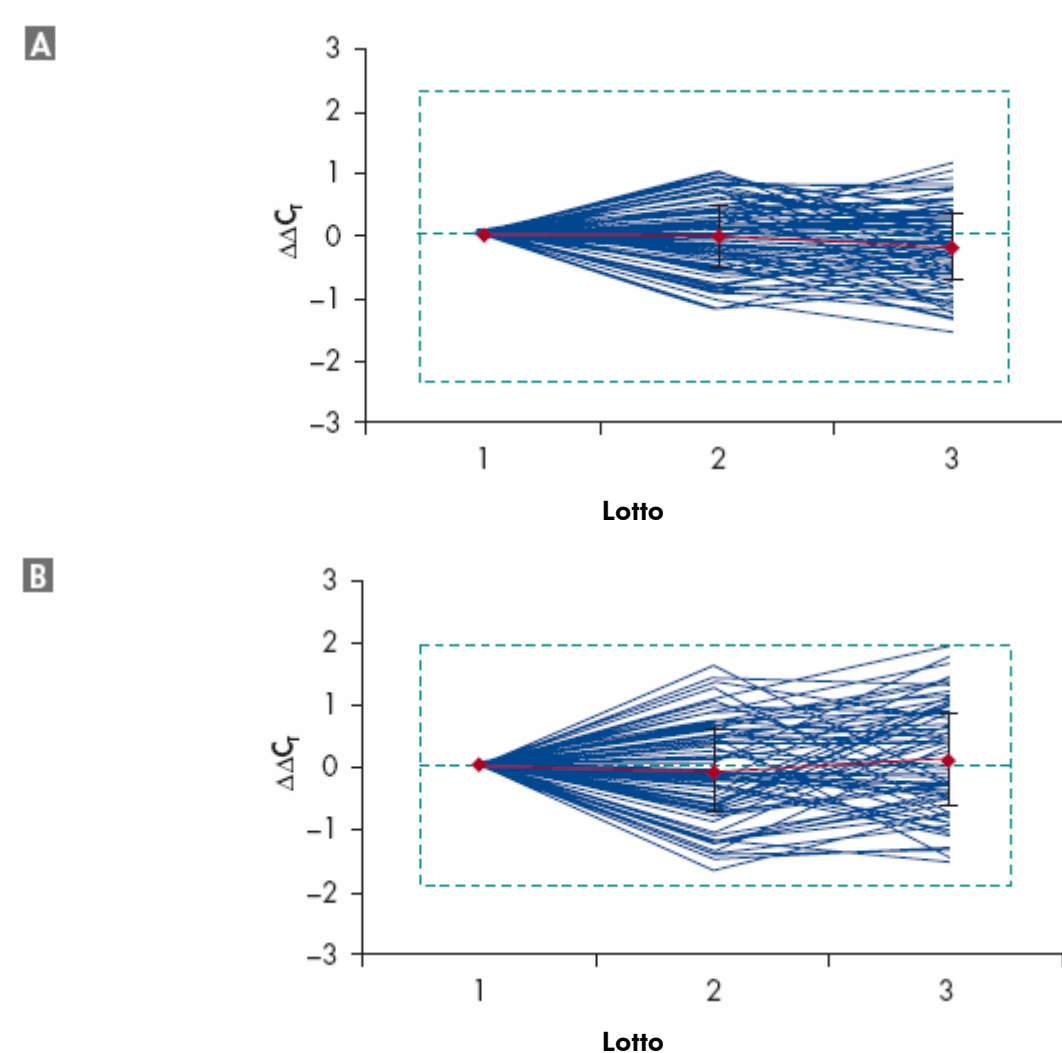



Figura 8 I campioni di RNA isolati nell'esperimento della figura 6 sono stati impiegati in esperimenti di real time RT PCR. I relativi livelli di trascrizione **A** FOS e **B** IL1B sono stati determinati tramite real-time RT PCR duplex impiegando rRNA 18S come standard interno. Sono riportati i valori di tutti i campioni, relativamente ai valori per lotto 1 (10 pool di donatori x 3 esecutori x 4 ripetizioni = 120 set di dati per ogni gene) con valore medio (linea rossa) e deviazione standard (barra nera). Le linee tratteggiate indicano il range della precisione degli assay (±3x precisione totale di ± 2,34 C_t (FOS) e ± 1,93 C_t (IL1B).

Tabella 2. Riepilogo dei risultati RT-PCR (riportati in Fig. 7 e 8)

Sistema del test	FOS/18S rRNA assay		IL1B/18S rRNA assay	
Confronto tra I dati	Media ($\Delta\Delta$ C_T)	±SD ($\Delta\Delta$ C_T)	Media ($\Delta\Delta$ C_T)	±SD ($\Delta\Delta$ C_T)
Riproducibilità tra tutti i lotti per ogni tecnico				
Tutti i tecnici, lotto 1 – lotto 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Tutti i tecnici, lotto 2 – lotto 2	–0,03	0,48	–0,07	0,66
Tutti i tecnici, lotto 3 – lotto 3	–0,21	0,52	0,11	0,71
Riproducibilità tra tutti i tecnici e all'interno di ogni lotto				
Tutti i lotti, tecnico A – tecnico A	0,00	0,00	0,00	0,00
Tutti i lotti, tecnico A – tecnico B	–0,46	0,44	–0,06	0,69
Tutti i lotti, tecnico A – tecnico C	–0,31	0,60	–0,15	0,71

Tecnico: assistente tecnico che ha eseguito gli esperimenti.

Lotto: numero di lotto del kit impiegato.

SD: deviazione standard.

Sono riportati i valori medi dei valori $\Delta\Delta C_T$ (N = 120) e le deviazioni standard dei dati rappresentati nelle figure 7 e 8.

Purificazione dell'RNA in automatico

La preparazione del campione usando il QIAcube® segue le stesse fasi della procedura manuale e permette così di continuare ad usare il PAXgene Blood RNA Kit per purificare RNA di alta qualità. Vedi il *QIAcube User Manual* e www.qiagen.com/MyQIAcube per ulteriori informazioni sul QIAcube.

Il protocollo per la purificazione dell'RNA in automatico consiste di 2 parti (o protocolli), il "PAXgene Blood RNA Part A" e il "PAXgene Blood RNA Part B", con un breve intervento manuale tra le due parti.

Il pellet dell'acido nucleico centrifugato, lavato e risospeso (vedi "Concentrazione e purificazione dell'RNA", pag. 16) viene trasferito dalla PAXgene Blood RNA Tube (BRT) nelle provette di reazione (PT) che sono posizionate nell'unità termoshaker sul piano di lavoro QIAcube. L'operatore seleziona e fa partire il protocollo del PAXgene Blood RNA Part A" dal menu. Il QIAcube esegue le fasi del protocollo attraverso l'eluizione dell'RNA nel buffer di eluizione (BR5). L'operatore trasferisce i tubi per microcentrifuga (MCT), contenenti l'RNA purificato, nell'unità termoshaker del QIAcube. L'operatore seleziona e fa partire il protocollo "PAXgene Blood RNA Part B" dal menu e il QIAcube esegue la denaturazione a caldo.

Il tempo medio di preparazione del campione (basato sui dati di 12 preparazioni di campioni) è di 125 minuti, con circa 20 minuti di lavoro manuale.

Le rese dell'RNA da 2,5 ml di sangue umano intero sono ≥3 μg per ≥95% dei campioni processati. La figura 9 indica le rese dell'RNA da un totale di 288 campioni preparati usando il protocollo automatico con 3 lotti di kit con tre diversi esecutori. Quando per questi studi sono stati usati campioni di sangue in pool invece delle singole PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), i risultati non riflettono la resa dell'RNA attesa dai singoli campioni degli estratti di sangue individuali. Poiché le rese dipendono molto dal donatore, le rese individuali possono variare (Figura 9).

Resa dell'RNA – Procedura in automatico

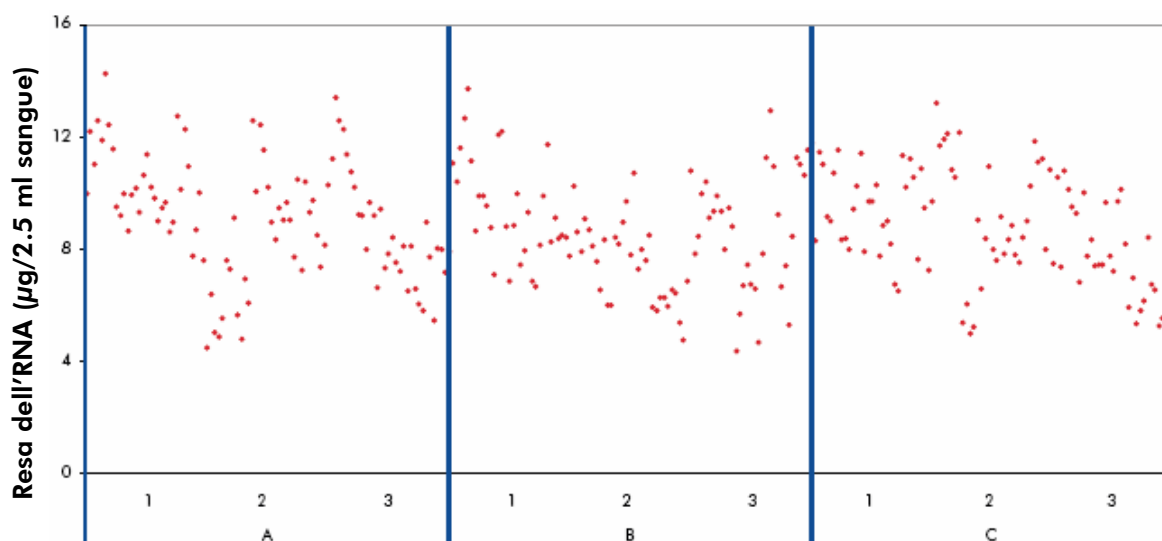



Figura 9 Campioni di sangue di 48 differenti donatori sono stati raccolti nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 6 provette per donatore, 288 provette in totale). Il contenuto dei campioni da 6 donatori sono stati messi in pool e rialiquotati in 36 campioni. Questi 36 campioni per un pool di 6 donatori sono stati processati da 3 differenti operatori (A,B e C). Ogni esecutore ha usato 3 differenti lotti (1,2,3) del PAXgene Blood RNA Kit per l'estrazione in automatico e ha processato campioni quadruplicati da ognuno degli 8 pool di donatori. Le rese di RNA per tutti i campioni individuali sono mostrati per ogni combinazione esecutore-lotto.

Almeno 95% dei campioni non ha mostrato inibizione nella RT-PCR, quando si è usato più del 30% dell'eluato. Usando il protocollo in automatico, non sono rilevabili contaminazioni crociate tra i campioni, come misurato con la RT-PCR quantitativa in tempo reale di sequenze della betaglobina e dei trascritti FOS in campioni RNA-Negativi (acqua) insieme a campioni RNA-Positivi (campioni di sangue intero) nella stessa corsa.

L'RNA purificato con il sistema PAXgene Blood RNA e il protocollo in automatico é estremamente puro, come evidente dall'assenza di un'inibizione di RT-PCR (vedi sopra) e dai valori A_{260}/A_{280} tra 1,8 e 2,2. Il DNA genomico è presente a ≤1% (w/w) in ≥95% di tutti i campioni, come misurato dalla PCR quantitativa in tempo reale di una sequenza del gene beta-actin. Le figure 10 e 11 mostrano i valori A_{260}/A_{280} e il DNA genomico relativo di un totale di 288 campioni preparati usando il protocollo in automatico con 3 lotti di kit usati da tre esecutori.

Purezza dell'RNA (valori A_{260}/A_{280}) — Procedura in automatico

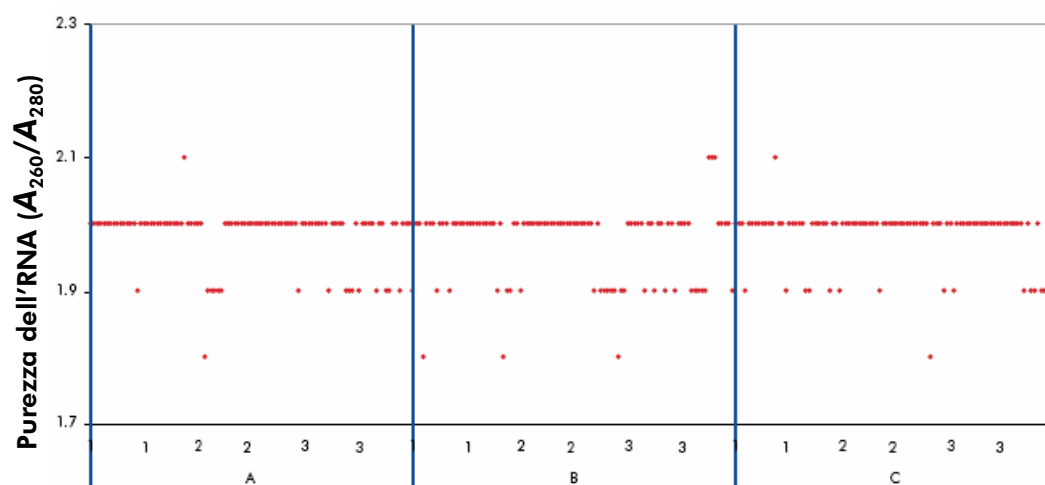



Figura 10 L'RNA è stato purificato da 3 differenti esecutori (A,Be C) usando 3differenti lotti (1,2 e 3) del PAXgene Blood RNA Kit nell'esperimento descritto in Figura9. I valori A260/A280 di tutti I campioni individuali sono mostrati perognicombinazione esecutore-lotto.

Purezza dell'RNA (% della contaminzaione del DNA genomico) — Procedura in automatico

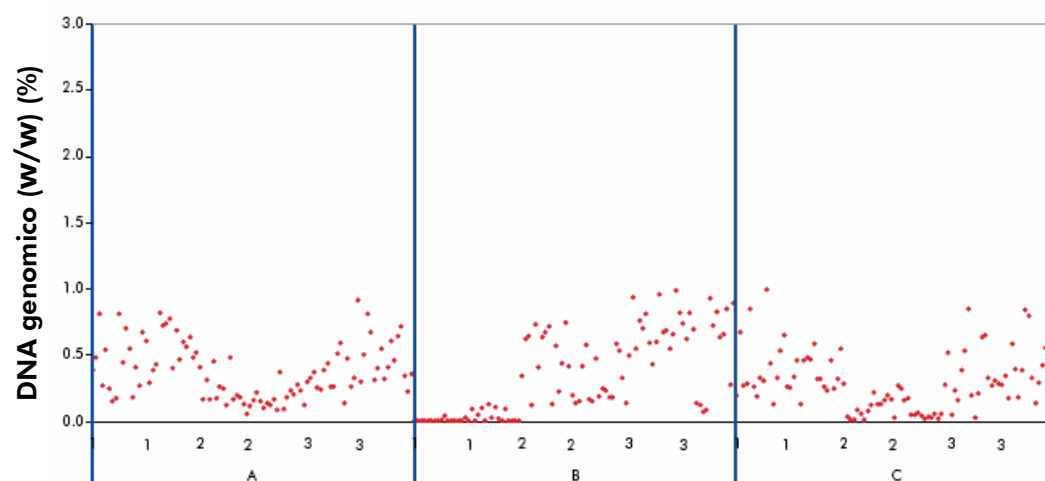



Figura 11 L'RNA è stato purificato da 3 diversi esecutori (A, B,C) usando tre diversi lotti (1,2,3) del PAXgene Blood RNA Kit nell'esperimento descritto nella figura 9. Le quantità di DNA genomico (w/w) in tutti I campioni individuali sono mostrate per ogni combinazione esecutore-lotto.

Il protocollo in automatico della purificazione dell'RNA usando il sistema PAXgene Blood RNA fornisce risultati RT-PCR altamente riproducibili e ripetibili, come mostrato nella Figura 12, rendendolo estremamente robusto per test clinici diagnostici.

Riproducibilità della RT-PCR — tra protocolli in automatico e manuali

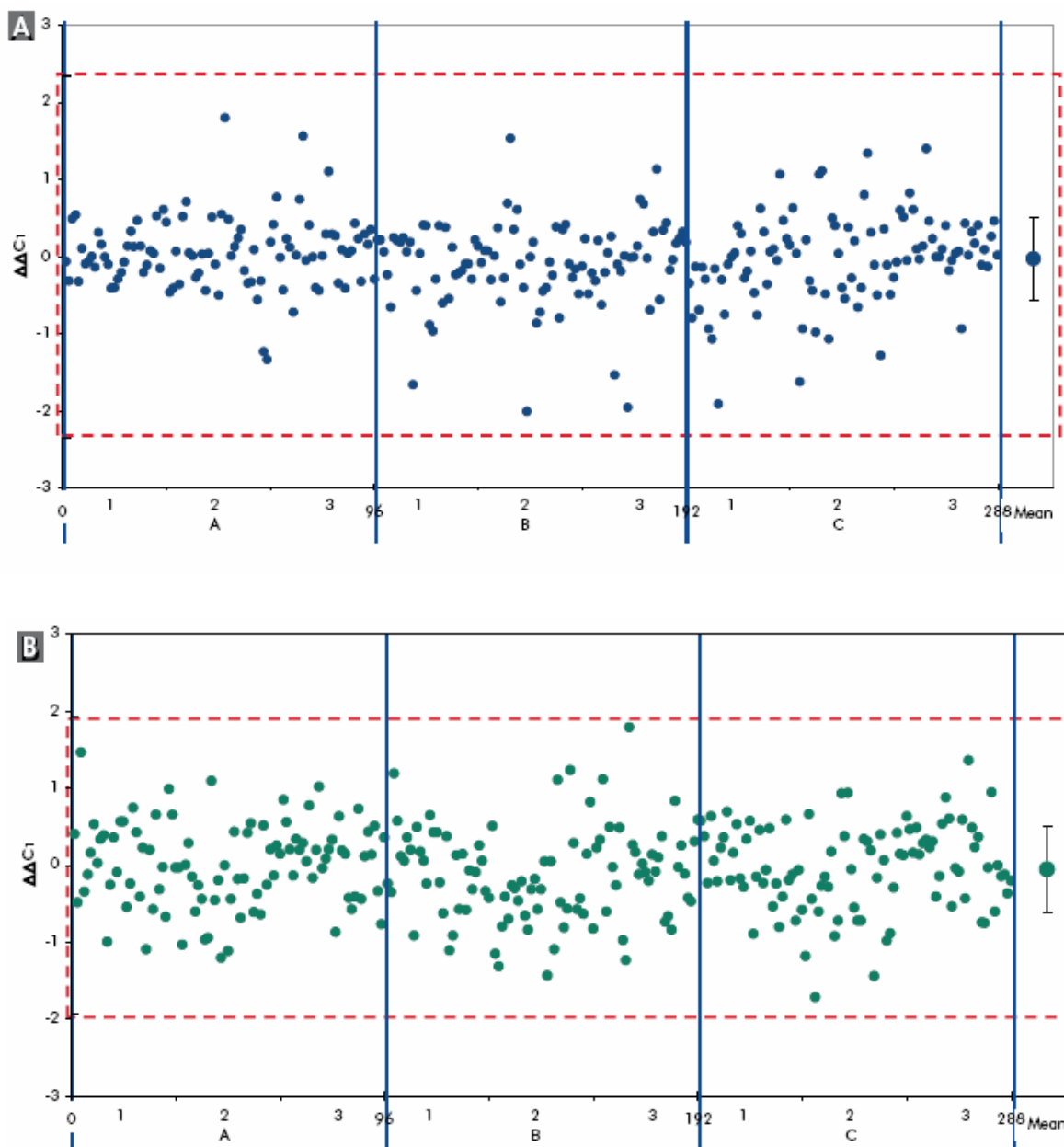



Figura 12 L'RNA è stato purificato da tre diversi esecutori (A,B,C) usando 2 diversi lotti (1,2,3) del PAXgene Blood RNA Kit e il protocollo in automatico nell'esperimento descritto in Figura 9. In parallelo, l'RNA è stato purificato dalle corrispondenti provette in duplicati usando il protocollo manuale. I livelli relativi dei trascritti di A FOS e B IL1B sono stati determinati per real-time, duplex RT-PCR usando 18S rRNA come standard interno. Possibili differenze dei livelli di trascritti tra RNA preparato da campioni di sangue in coppia usando entrambi i protocolli di estrazione (in automatico e manuale) sono stati calcolati dal metodo $\Delta\Delta C_T$ .Valori $\Delta\Delta C_T$ individuali per tutte le coppie di campione (4 replicati per 8 pool di donatori per 3kit di lotti per 3 donatori= 288 coppie per ogni gene) sono segnati come singoli punti con medie (punti più grandi)e deviazioni standard (barre nere) per tutti campioni mostrati. Le linee tratteggiate indicano la precisione totale ±3x dei test (FOS: 2.34 C_T; IL1B, 1.93 C_T).

Attrezzature e reagenti richiesti ma non forniti

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per ulteriori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza dei materiali (MSDS), disponibili presso il produttore.

Per tutti i protocolli

- Provette PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; n. cat. 7642165)
- Etanolo (96–100%, grado di purezza p.a.)
- Pipette* (10 µl – 4 ml)
- Puntali sterili privi di RNasi† con barriere aereosol anticontaminazione.
- Cilindro graduato‡
- Centrifuga* in grado di raggiungere 3000–5000 x g, con rotore basculante e alloggiamenti per le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Vortex*
- Ghiaccio tritato
- Pennarello permanente per scrivere sulle etichette

Per il protocollo manuale

- Microcentrifuga a velocità variabile capace di arrivare a 1000–8000 x g e con rotore per provette da microcentrifuga da 2ml.
- Incubatore– agitatore * in grado di incubare a 55°C e 65°C e di miscelare a ≥ 400 rpm; max. 1400 rpm (ad es. Eppendorf® Thermomixer Compact o equivalente)

Per il protocollo in automatico

- QIAcube* (QIAGEN, cat. no. 9001292 [110 V], cat. no. 9001293 [230 V])
- Materiali di consumo per QIAcube
  - Puntali per filtro, 1000 µl (1024) (QIAGEN, cat. no. 990352)§
  - Flaconi per reagenti, 30 ml (6) (QIAGEN, cat. no. 990393)§
  - Adattatori per rotore (10 x 24) (QIAGEN, cat. no. 990394)§

* Assicurarsi che lo strumento sia stato controllato e calibrato regolarmente in base alle indicazioni del produttore.

† Se si prepara l'RNA per la prima volta, prima della preparazione, leggere le linee guida per il trattamento dell'RNA" (vedi Appendice A, pag. 56).

‡ Per l'aggiunta di etanolo al tampone BR4 concentrato.

- Accessori QIAcube
    - Rack (rastrelliera) per flaconi per reagenti (QIAGEN, cat. no. 990390)§
    - Supporto per l'adattatore del rotore (QIAGEN, cat. no. 990392)§
- Forbici

Note importanti

Uso del QIAcube

Assicurarsi di avere familiarità con il QIAcube. Leggere il *QIAcube User Manual* e ogni informazione ulteriore allegata al QIAcube, ponendo particolare attenzione alle informazioni di sicurezza, prima di iniziare i protocolli PAXgene Blood RNA in automatico.

Avviamento del QIAcube

Chiudere lo sportello del QIAcube e accendere il QIAcube con il tasto di accensione (vedi Figura 13).
Si sentirà un beep e apparirà lo schermo di start up. Lo strumento esegue automaticamente i test di inizializzazione.

Installazione dei protocolli sul QIAcube

É richiesta l'installazione iniziale di un protocollo prima che venga eseguita la prima corsa di preparazione dell'RNA sul QIACube. Installare entrambi i protocolli "PAXgene Blood RNA Part A" and "PAXgene Blood RNA Part B".

I protocolli sono disponibili a www.qiagen.com/MyQIAcube e devono essere scaricati sullo stick USB fornito con il QIAcube e trasferiti sul QIAcube tramite la porta USB.

La porta USB, posta dietro il pannello di protezione (vedi Figura 13), permette la connessione del QIAcube allo stick USB (fornito con il QIAcube). I files di dati,come i file di log e di report, possono essere anche trasferiti tramite la porta USB dal QIAcube allo stick USB.

ⓘ La porta USB è solo per l'uso con lo stick USB fornito da QIAGEN. Non connettere altri dispositivi a questa porta.

ⓘ Non rimuovere lo stick USB mentre si scaricano protocolli o mentre si trasferiscono file di dati o durante l'esecuzione di un protocollo.

§ Incluso nello Starter Pack, (QIAGEN, cat. no. 990395).

Parte anteriore del QIAcube

Figura 13

1 Touchscreen

2 Porta

3 RS232 porta seriale dietro il pannello protettivo (solo per l'uso da parte di specialisti del QIAGEN Instrument Service)

4 porta USB dietro il pannello di protezione

5 Tasto di accensione

6 Cassetto per rifiuti

Caricare il QIAcube

Per risparmiare tempo il caricamento può essere eseguito durante una o entrambe le fasi di centrifugazione (fase 3 e 5) in "Protocollo: Purificazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", pag. 48.

Flaconi per reagenti

Riempire con cautela 4 flaconi per reagenti QIAcube con i reagenti elencati nella Tabella 3 (riempire i flaconi fino al livello indicato sulle stesse). Etichettare i flaconi e i tappi chiaramente con i nomi del tampone e porle nella posizione appropriata nel rack apposito (vedi Figure 14 e 15).

Prima di ogni corsa sul QIAcube assicurarsi che i flaconi per reagenti siano riempiti fino ai livelli indicatori (i volumi rimanenti nel kit originale dei flaconi di tampone dovrebbero essere usati per riempire i flaconi per reagenti). Posizionare il rack con i flaconi appositamente riempiti sul piano da lavoro del QIAcube come nelle figure (Figure 14 e 15).

ⓘ Assicurarsi di rimuovere i tappi dai flaconi prima di porli nel piano da lavoro.

ⓘ I volumi di tampone forniti nel PAXgene Blood RNA Kit (50) sono sufficienti per un massimo di 7 corse per la preparazione dell'RNA sul QIAcube. Si dovrebbero evitare corse multiple con pochi campioni per far sì che ci siano volumi sufficienti di tampone per processare tutti i 50 campioni.

Tabella 3. Posizioni nel rack per i flaconi di reagenti

Posizione	Reagente
1	Tampone di legame (BR2)
2	Etanolo 96–100%
3	Tampone di lavaggio 1 (BR3)
4	Tampone di lavaggio 2 (BR4)*
5	– (lasciare vuoto)
6	– (lasciare vuoto)

* Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito concentrato. Prima di usarlo la prima volta, per ottenere una soluzione che funzioni aggiungere 4 volumi di etanolo (96–100%, grado di purezza p.a.) come indicato sulla bottiglia.

Caricamento del rack per i flaconi di reagente

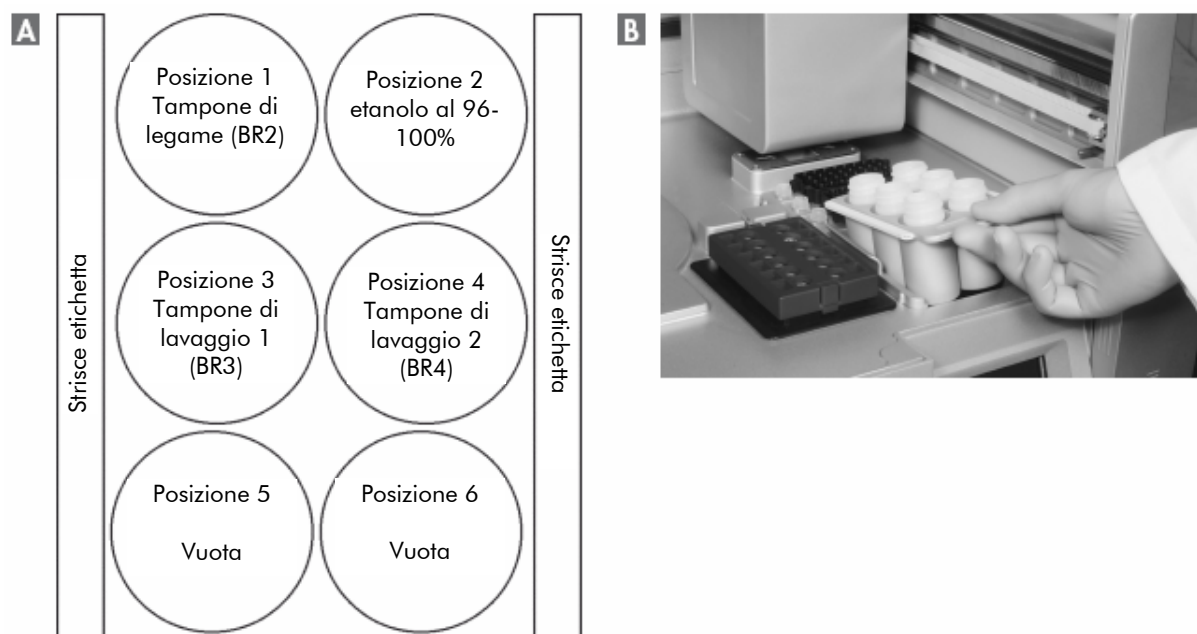



Figura 14 A Schema delle posizioni e dei contenuti dei flaconi nel rack dei flaconi per reagenti. B Caricamento del rack sul QIAcube.

Interno del QIAcube

Figura 15

1 Coperchio centrifuga
2 Centrifuga
3 Agitatore
4 Rack per i flaconi dei reagenti
5 Sensore per puntali
6 Slots per provetta da microcentrifuga
7 Rack per puntali
8 Slots per lo smaltimento di puntali e colonne
9 Braccio robot

Spin columns (PRC, PSC), provette per microcentrifuga (MCT) e oggetti plastici del QIAcube

Posizionare 2 racks per puntali con puntali per filtro da 1000 µl sul QIAcube (vedi Figura 15). Caricare i racks con altri puntali quando necessario.

ⓘ Usare solo puntali per filtro da 1000 µl destinati all'uso con il QIAcube.

Con un pennarello permanente etichettare gli adattatori per il rotore e le provette per microcentrifuga (MCT) per ogni campione. Aprire le colonne PAXgene Shredder (PSC) da usare e tagliare completamente I tappi con delle forbici (vedi Figura16).

ⓘ Per un corretto funzionamento della pinza robotica del QIAcube, rimuovere completamente (tagliare) i tappi e tutte le parti di plastica che uniscono il tappo alle colonne PAXgene shredder (PSC; vedi Figura 16). Diversamente la pinza robotica non può afferrare correttamente le spin columns (PSC, PRC).

Caricare la spin column PAXgene RNA (PRC), la colonna Shredder PAXgene (PSC, senza tappo) e la provetta per microcentrifuga (MCT) etichettata nelle posizioni relative in ciascun adattatore per rotore etichettato come riportato nella Tabella 4 e nella Figura 17 (pagina 38).

ⓘ Assicurarsi che i tappi della spin column (PRC) e della provetta per microcentrifuga (MCT) siano spinti completamente sul fondo degli slots al margine dell'adattatore del rotore, altrimenti i tappi potrebbero rompersi durante la centrifugazione.

Caricare una colonna PAXgene shredder (PSC)

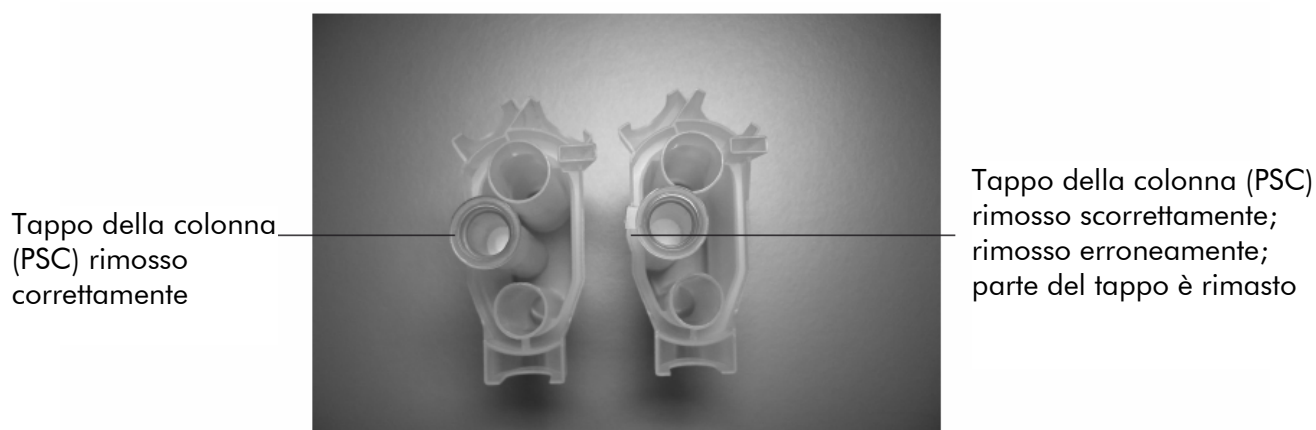



Figura 16 La Shredder column (PSC) PAXgene è caricata nella posizione centrale. Tagliare il tappo prima di caricare la colonna (PSC).

Tabella 4. Strumenti nell'adattatore per rotore

Posizione	Labware	Posizione tappo
1	Spin column PAXgene RNA (rossa, PRC)	L1
2	Colonna PAXgene Shredder (lilla, PSC) (tagliare il tappo prima di posizionare nell'adattatore per rotore)	–
3	Provetta per microcentrifuga (MCT)*	L3

* Usare le provette per microcentrifuga (1,5 ml, MCT) incluse nel kit PAXgene Blood RNA.

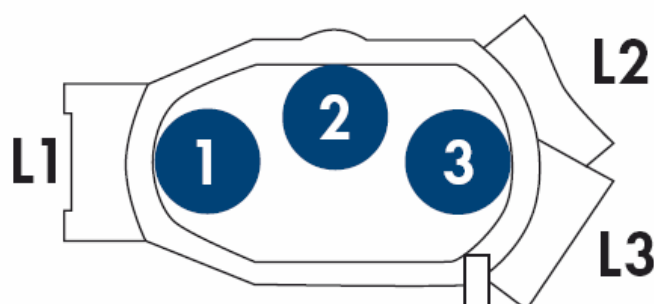



Figura 17 L'adattatore per rotore ha tre posizioni per provette (**1**-**3**) e tre posizioni per tappi (**L1–L3**).

Caricare la centrifuga

Caricare gli adattatori per rotore negli scomparti della centrifuga come in Figura 18.

Se si processano meno di 12 campioni,assicurarsi di caricare il rotore della centrifuga bilanciato radialmente (vedi Figura 19). Tutti gli scomparti della centrifuga devono essere montati prima di far partire un protocollo, anche se i campioni da processare sono meno di 12. Un singolo (uno) campione o 11 campioni non possono essere processati.

Caricare la centrifuga

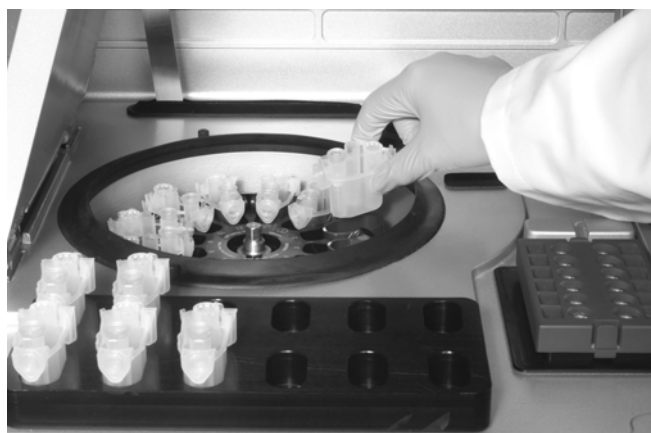



Figura 18 Caricamento degli adattatori per rotore assemblati negli scomparti della centrifuga.

Loading the Centrifuge and Shaker

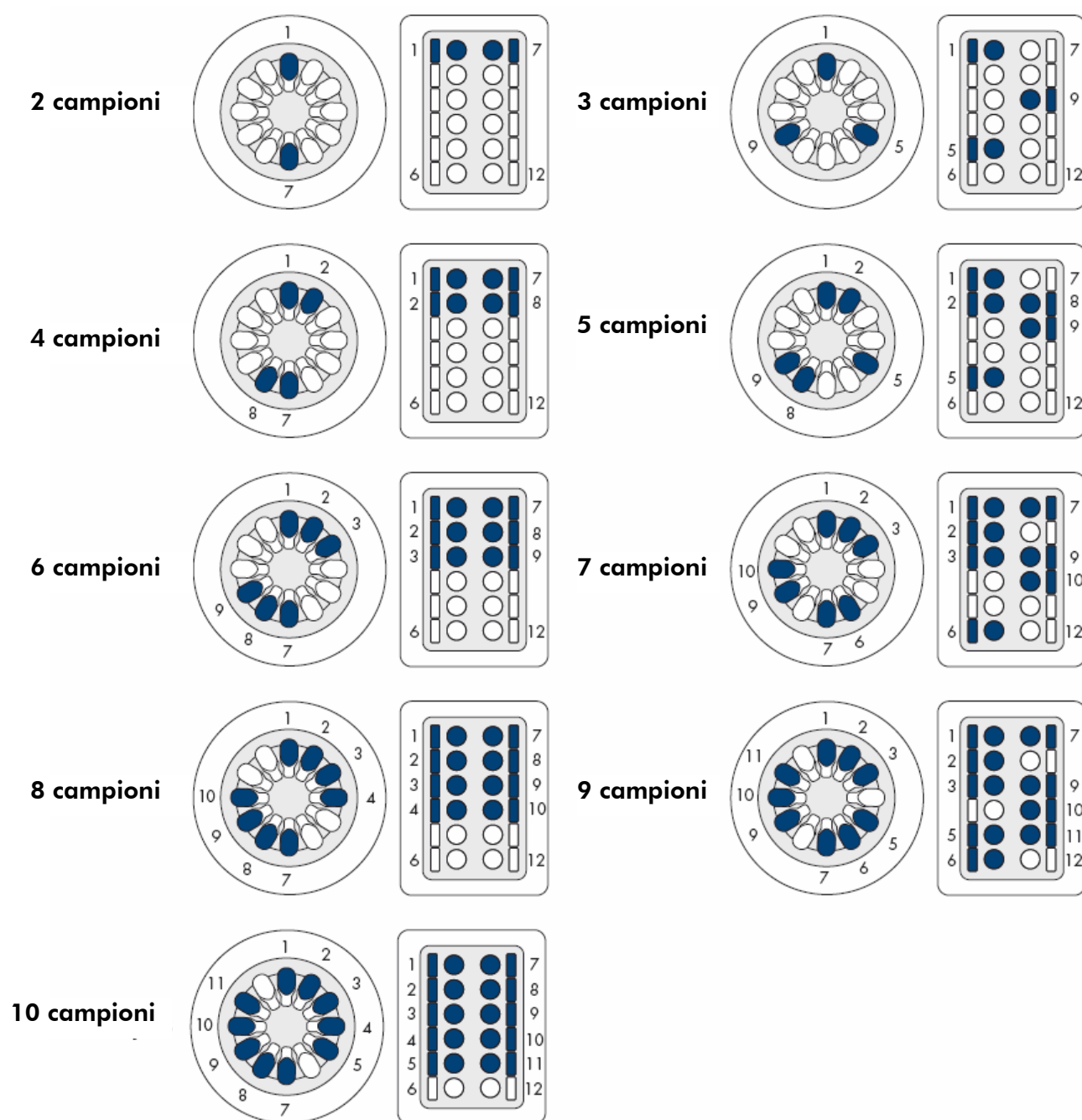



Figura 19 Le posizioni della centrifuga e dell'agitatore sono riportate per processare da 2 (**2 campioni**) a dieci (**10 campioni**). Uno o 11 campioni non possono essere processati.

Provette di reazione (PT)

Eliminare tutte le provette di reazione (PT) lasciate negli slot per provette da microcentrifuga e provenienti dalle corse precedenti (vedi Figura 15, pagina 36). Riempire le provette di reazione (PT) con la quantità di reagenti data nella Tabella 5. Etichettare chiaramente le provette (PT) con I nomi dei reagenti e posizionarle nella posizione appropriata negli slot per provette da microcentrifuga, come indicato nella Tabella 6. Pipettare il volume indicato di tampone per la digestione di DNA (RDD) in una provetta di reazione (PT) e aggiungere il volume indicato di soluzione stock DNase I (RNFD). Miscelare delicatamente il tutto pipettando su e giù tre volte, usando un puntale per pipetta da 1000 μl.

Usare le provette di reazione (PT) da 2 ml incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

ⓘ Assicurarsi di pipettare solo il volume richiesto come indicato nella Tabella 5.

Tabella 5. Volume dei reagenti richiesto nelle provette di reazione **per gli slots delle provette da microcentrifuga**

	Volume di regente richiesto per il numero di campioni indicato (μl)		
Numero di campioni	**Proteinasi K (PK)**	**Mix per incubazione di DNase I**	**Tampone di eluzione (BR5)**
2	126	187 (23 DNase I [RNFD] + 164 RDD)	313
3	170	260 (33 DNase I [RNFD] + 228 RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I [RNFD] + 292 RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I [RNFD] + 356 RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I [RNFD] + 421 RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I [RNFD] + 485 RDD)	745
8	386	628 (78 DNase I [RNFD] + 549 RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I [RNFD] + 613 RDD)	918
10	472	774 (97 DNase I [RNFD] + 678 RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I [RNFD] + 806 RDD)	1177

Tabella 6. Slots delle provette da microcentrifuga

	Posizione		
	A	B	C
Contenuto	Proteinasi K (PK)	Mix per incubazione DNase I	Tampone di eluzione (BR5)
Recipiente	provetta di reazione (PT)*	provetta di reazione (PT)*	provetta di reazione (PT)*

* Usare le provette di reazione (PT) da 2 ml incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

Protocollo: Purificazione manuale dell’RNA totale dal sangue intero umano nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Accorgimenti importanti prima di iniziare la preparazione

- Assicurarsi che la confezione del kit sia intatta e non danneggiata e che i tamponi non mostrino perdite. Non utilizzare un kit danneggiato.
- Quando si utilizza una pipetta, assicurarsi che sia impostata sul volume corretto e che il liquido venga aspirato e dispensato completamente.
- Per evitare di trasferire un campione alla provetta o alla colonna sbagliata, assicurarsi che tutte le provette e le colonne siano etichettate in modo appropriato con un pennarello indelebile. Applicare un’etichetta al tappo e alla parete esterna(PT, MCT). Per le colonne applicare un’etichetta alla parete esterna della loro provetta di reazione (PT). Dopo avervi trasferito il liquido chiudere sempre ogni provetta e ogni colonna.
- Versamenti di campioni e tamponi durante la procedura possono ridurre resa e purezza dell’RNA.
- Se non indicato diversamente, tutte le fasi di questo protocollo, incluse quelle di centrifugazione, devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).
- A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici (PCR), durante la manipolazione dei campioni è necessario attenersi alle seguenti precauzioni per evitare contaminazioni crociate:
  - Pipettare con attenzione il campione nella colonna (PRC, PSC) senza bagnarne il bordo.
  - Fra un trasferimento di liquido e l’altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Utilizzare puntali con barriera aereosol.
  - Non toccare la membrana della colonna (PRC, PSC) con il puntale della pipetta.
  - Dopo la miscelazione con vortex o il riscaldamento di una provetta (MCT), centrifugare brevemente per rimuovere le gocce all’interno del tappo.
  - Indossare i guanti per tutta la durata della preparazione. In caso di contatto fra guanti e campione, sostituire immediatamente i guanti.
  - Chiudere sempre la colonna (PRC, PSC) prima di posizionarla nella microcentrifuga. Centrifugare come descritto nel protocollo.
  - Aprire una colonna (PRC, PSC) per volta, facendo attenzione a non creare aerosol.

- Per un'efficiente elaborazione in parallelo di campioni multipli, preparare un rack con provette di reazione (PT) in cui trasferire le colonne (PRC, PSC) dopo la centrifugazione. Smaltire le provette (PT) che contengono gli eluati e disporre le nuove provette di reazione (PT) con le colonne (PRC, PSC) direttamente nella microcentrifuga.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare il protocollo

- Il sangue va raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) secondo le istruzioni della descrizione del prodotto *PAXgene Blood RNA Tube*. Se necessario, vedere Appendice C (pagina 59) per le raccomandazioni riguardo le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Assicurarsi che le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) vengano incubate per almeno 2 ore a temperatura ambiente dopo il prelievo di sangue, per garantire la completa lisi delle cellule ematiche. L'incubazione delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) per tutta la notte può aumentare la resa. Se una delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) è stata conservata a 2–8°C o –20°C o –70°C dopo il prelievo del sangue, equilibrarla a temperatura ambiente e incubarla per almeno 2 ore prima di iniziare il protocollo.
- Leggere le informazioni di sicurezza a pagina 7.
- Leggere le linee guida sulla manipolazione dell'RNA (Appendice A, pagina 56).
- Assicurarsi che gli strumenti, ad es. pipette e incubatore–agitatore, vengano controllati e calibrati regolarmente in base alle indicazioni del produttore.
- Per i passaggi 5 e 20 è necessario un incubatore–agitatore. Impostare la temperatura di questo strumento a 55°C.
- Dopo una lunga conservazione il tampone di legame (BR2) può formare un precipitato. Se necessario, riscaldare a 37°C per discioglierlo.
- Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96-100%, grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.
- Se si utilizza il set DNAsi privo di RNAsi per la prima volta, preparare una soluzione stock di DNAsi I. Sciogliere la DNAsi (RNFD; 1500 unità Kunitz) in 550 μl di tampone di risospensione DNAsi presente nel kit. Assicurarsi di non disperdere DNAsi I aprendo la fiala. La DNAsi I ricostituita non deve essere miscelata su vortex. La DNAsi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo e/o agitando piú volte la provetta.

* L'unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNAsi I. Un'unità Kunitz si definisce come la quantità di DNAsi I, che a 260 nm (A260) provoca un aumento dell'assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25° C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. 33, 349 e 363).

- Dati attualmente disponibili mostrano che la DNAsi I ricostituita (RNFD) si mantiene stabile per 6 settimane se conservata a 2-8°C. Per periodi più lunghi, rimuovere la soluzione concentrata dalla fiala in vetro, suddividerla in aliquote monouso (utilizzare provette per microcentrifuga da 1,5 ml [MCT] presenti nel kit; sono sufficienti per 5 aliquote) e conservarla a –20°C fino a 9 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2–8°C fino a 6 mesi. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.
- Quando si ricostituisce e si aliquota la DNasi I (RNFD), attenersi alle "Note generali per il trattamento dell'RNA" (Appendice A, pagina 56).

Esecuzione

1. **Centrifugare la PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) per 10 minuti a 3000–5000 x g utilizzando un rotore basculante.**

   ⓘ Assicurarsi che i campioni di sangue siano stati incubati nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 ore a temperatura ambiente (15–25°C), per garantire la completa lisi delle cellule ematiche.

   ⓘ Il rotore deve contenere adattatori per provette a fondo arrotondato. Se si utilizzano altri tipi di adattatori le provette possono danneggiarsi durante la centrifugazione.

2. **Rimuovere il sovranatante per decantazione o pipettamento. Aggiungere al pellet 4 ml di acqua priva di RNasi (RNFW) e chiudere la provetta con una nuova chiusura Hemogard BD (fornita con il kit).**

   Se il sovranatante viene eliminato per decantazione, fare attenzione a non staccare il pellet e asciugare il bordo della provetta con carta assorbente pulita.

3. **Miscelare con il vortex finché il pellet non si scioglie e centrifugare per 10 minuti a 3000–5000 x g utilizzando un rotore basculante. Rimuovere ed eliminare tutto il sovranatante.**

   Eventuali detriti cellulari che rimangono nel sovranatante dopo la miscelazione con vortex non influenzano la procedura.

   ⓘ La rimozione incompleta del sovranatante inibisce la lisi e diluisce il lisato, compromettando le condizioni di legame dell'RNA alla membrana PAXgene.

4. **Aggiungere 350 µl di tampone di risospensione (BR1) e miscelare su vortex fino alla completa dissoluzione del pellet.**

5. **Pipettare il campione in una provetta (MCT) da 1,5 ml. Aggiungere 300 µl di tampone di legame (BR2) e 40 µl di proteinasi K (PK). Miscelare su vortex per 5 secondi, quindi incubare a 55°C per 10 minuti utilizzando un incubatore–agitatore a 400–1400 rpm. Dopo**

l'incubazione, impostare la temperatura dell'incubatore– agitatore a 65°C (per la fase 20).

ⓘ Non mescolare il tampone di legame (BR2) e la proteinasi K (PK) prima di aggiungerli al campione.

6. **Pipettare il lisato direttamente nella colonna PAXgene Shredder (PSC: lilla) posta in una provetta di reazione da 2 ml (PT) e centrifugare per 3 minuti alla velocità massima (non superiore a 20000 x g).**

   ⓘ Pipettare con attenzione il lisato nella colonna (PSC) e controllare che il lisato sia trasferito completamente alla spin column (PSC).

   Per evitare danni a colonne (PSC) e provette di reazione (PT), non superare 20 000 x g.

   ⓘ Alcuni campioni possono uscire dalla colonna PAXgene Shredder (PSC) senza centrifugazione. Questo è dovuto alla bassa viscosità di alcuni campioni e non dovrebbe essere considerato un difetto del prodotto.

7. **Con la massima cura, trasferire il sovranatante della frazione eluita in una provetta per microcentrifuga pulita da 1,5 ml (MCT) senza interferire con il pellet nella provetta di reazione.**

8. **Aggiungere 350 µl di etanolo (96–100 %, grado di purezza p.a.). Miscelare su vortex e centrifugare brevemente (1-2 secondi a 500-1000 x g) per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.**

   ⓘ La durata della centrifugazione non deve superare 1-2 secondi; in caso contrario possono precipitare gli acidi nucleici riducendo la resa di RNA totale.

9. **Pipettare 700 µl di campione in una spin column PAXgene RNA (PRC: rossa) posta precentamente in una provetta di reazione da 2 ml (PT) e centrifugare per 1 minuto a 8000–20000 x g. Disporre la colonna (PRC) in una nuova provetta di reazione da 2 ml (PT) e smaltire la provetta di reazione (PT) con il liquido eluito.**

10. **Pipettare il campione rimanente in una spin column PAXgene RNA (PRC) e centrifugare per 1 minuto a 8000-20000 x g. Disporre la colonna (PRC) in una nuova provetta di reazione da 2 ml (PT) e smaltire la provetta di reazione con il liquido eluito.**

    ⓘ Pipettare con attenzione il campione nella colonna (PRC) e controllare che il campione sia completamente trasferito nella colonna (PRC).

11. **Pipettare 350 µl di tampone di lavaggio 1 (BR3) nella colonna per centrifugazione PAXgene RNA (PRC). Centrifugare per 1 minuto a**

8000-20000 x g. Disporre la colonna (PRC) in una nuova provetta di reazione da 2 ml (PT) e smaltire la provetta di reazione (PT) utilizzata con il liquido eluito.

12. **Aggiungere 10 µl di soluzione stock di DNasi I (RNFD) a 70 µl di tampone per la digestione del DNA (RDD) in una provetta da 1,5 ml (MCT). Miscelare dando dei leggeri colpetti con le dita alla provetta e centrifugare brevemente per raccogliere il liquido residuo dalle pareti interne della provetta.**

    Se si opera, ad esempio, su 10 campioni, aggiungere 100 µl di soluzione concentrata di DNasi I (RNFD) a 700 µl di tampone di digestione DNA (RDD). Utilizzare le provette da 1,5 ml (MCT) in dotazione con il kit.

    ⓘ La DNasi I è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Per questo motivo miscelare la soluzione solo dando leggeri colpetti con le dita alla provetta. Non utilizzare il vortex.

13. **Pipettare la miscela di incubazione DNasi I (80 µl), direttamente alla membrana della colonna PAXgene RNA (PRC) e lasciare sul piano di lavoro (20–30°C) per 15 minuti.**

    ⓘ Assicurarsi di pipettare la miscela di incubazione di DNasi I (RNFD) e di tampone (RDD) direttamente alla membrana. Se parte della miscela rimane sulle pareti o sull'O-ring della colonna per centrifugazione (PRC) la digestione della DNasi può risultare incompleta.

14. **Pipettare 350 µl di tampone di lavaggio 1 (BR3) in una spin column PAXgene RNA (PRC) e centrifugare per 1 minuto a 8000-20000 x g. Disporre la colonna (PRC) in una nuova provetta di reazione da 2 ml (PT) e smaltire la provetta di reazione (PT) con il liquido eluito.**

15. **Pipettare 500 µl di tampone di lavaggio 2 (BR4) in una spin column PAXgene RNA (PRC) e centrifugare per 1 minuto a 8000-20000 x g. Disporre la colonna (PRC) in una provetta di reazione da 2 ml (PT) e smaltire la provetta di reazione (PT) con il liquido eluito.**

    ⓘ Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Assicurarsi di avere aggiunto etanolo al tampone di lavaggio 2 (BR4) prima dell'uso (vedere "Accorgimenti importanti prima di iniziare la preparazione", pagina 42).

16. **Pipettare 500 µl di tampone di lavaggio 2 (BR4) nella colonna PAXgene RNA (PRC). Centrifugare per 3 minuti a 8000–20000 x g.**

17. **Smaltire la provetta di reazione (PT) con il liquido eluito e disporre la colonna PAXgene RNA (PRC) in una nuova provetta di reazione da 2 ml (PT). Centrifugare per 1 minuto a 8000–20000 x g.**

18. Smaltire la provetta di reazione (PT) con il liquido eluito. Disporre la colonna PAXgene RNA (PRC) in una provetta da 1,5 ml (MCT) e pipettare 40 *µ*l di tampone di eluizione (BR5) direttamente alla membrana della colonna PAXgene RNA (PRC). Centrifugare per 1 minuto a 8000–20000 x g per eluire l'RNA.

Per la massima efficienza di eluizione è importante bagnare l'intera membrana con il tampone di eluizione (BR5).

19. Ripetere la fase di eluizione (passaggio 18) come descritto, utilizzando 40 *µ*l di tampone di eluizione e la stessa provetta da 1,5 ml (MCT).

20. Incubare l'eluato per 5 minuti a 65°C nell'incubatore–agitatore (vedi passaggio 5) peró senza agitare. Dopo l'incubazione raffreddare immediatamente in ghiaccio.

ⓘ Questa incubazione a 65°C denatura l'RNA per applicazioni downstream. Non superare tempo e temperatura di incubazione.

21. Se i campioni di RNA non vengono utilizzati immediatamente, conservarli a –20°C o –70°C. Poiché l'RNA rimane denaturato dopo ripetuti passaggi di congelamento/scongelamento, non è necessario ripetere l'incubazione a 65°C. Se si utilizzano i campioni di RNA per test diagnostici, attenersi alle istruzioni fornite dal produttore.

Per una più precisa e attendibile quantificazione dell'RNA misurando l'assorbimento a 260 nm consigliamo di diluire il campione con 10 mM di Tris-Cl (pH 7,5)*. Una diluizione del campione con acqua priva di RNAsi potrebbe portare a risultati imprecisi o troppo bassi. Per azzerare il fotometro utilizzare lo stesso tampone nel quale è diluito l'RNA e aggiungere lo stesso volume di tampone di eluizione (BR5) che corrisponde al volume dell'RNA eluito. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, cosa che può portare ad alti valori di assorbimento di sfondo se lo zero del fotometro spettrale non è stato impostato correttamente.

Notare: per determinare la concentrazione di RNA nel tampone tris utilizzare il rapporto A_{260} = 1 = > 44 *µ*g/ml (vedi Appendice B a pagina 57)

* Quando si opera con sostanze chimiche indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per ulteriori informazioni consultare le relative schede di sicurezza dei materiali (MSDS)

Protocollo: Purificazione in automatico dell'RNA totale da sangue umano intero raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Importante prima di iniziare

- Assicurarsi che la confezione del kit sia intatta e non danneggiata e che la provette dei tamponi non mostrino perdite. Non utilizzare un kit danneggiato.
- Quando si utilizza una pipetta, assicurarsi che sia impostata sul volume corretto e che il liquido venga aspirato e dispensato completamente.
- Per evitare di trasferire un campione alla provetta o alla colonna sbagliata, assicurarsi che tutti le provette di reazione (PT), le provette (MCT) e gli adattatori per rotore siano etichettate in modo appropriato con un pennarello indelebile. . Applicare un'etichetta al tappo e alla parete esterna di ogni provetta (MCT) e di ogni la provetta di reazione (PT)e alla parete esterna di ogni adattatore per rotore.
- Versamenti di campioni e tamponi durante la procedura possono ridurre resa e purezza dell'RNA.
- Se non indicato diversamente, tutte le fasi di questo protocollo, incluse quelle di centrifugazione, devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).
- A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici (PCR), durante la manipolazione dei campioni è necessario attenersi alle seguenti precauzioni per evitare contaminazioni crociata:
    - Pipettare con attenzione il campione nella provetta di reazione (PT) sul fondo della provetta senza bagnarne il bordo.
    - Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Utilizzare puntali con barriera aereosol anticontaminazione.
    - Non toccare la membrana della colonna (PRC, PSC) con il puntale della pipetta.
    - Dopo la miscelazione con vortex o il riscaldamento di una provetta (MCT), centrifugare brevemente per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
    - Indossare i guanti per tutta la durata della preparazione. In caso di contatto fra guanti e campione, sostituire immediatamente i guanti.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare il protocollo

- Il sangue deve essere raccolto nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) secondo le istruzioni nella descrizione del prodotto delle PAXgene Blood RNA Tube. –Se necessario,vedere l'Appendice C (pagina 59) per consigli sull'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Assicurarsi che le PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) vengano incubate per almeno 2 ore a temperatura ambiente dopo il prelievo di sangue, per garantire la completa lisi delle cellule ematiche. Incubazione delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) per tutta la notte può aumentare la resa. Se una delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) è stata conservata a 2–8°C o –20°C o –70°C dopo il prelievo del sangue, equilibrarla a temperatura ambiente e incubarla per almeno 2 ore prima di iniziare il protocollo.
- Leggere le informazioni di sicurezza a pagina 7.
- Leggere "Noti importanti", pagine 32-42
- Leggere le linee guida sulla manipolazione dell'RNA (Appendice A, pagina 56).
- Leggere il QIAcube User Manual e ogni ulteriore informazione fornita con il QIAcube, prestando particolare attenzione alle informazioni di sicurezza.
- Assicurarsi che gli strumenti come le pipette e il QIAcube siano stati controllati e calibrati regolarmente secondo le raccomandazioni del produttore.
- Dopo una lunga conservazione il tampone di legame (BR2) può formare un precipitato. Se necessario, riscaldare a 37°C per discioglierlo.
- Il tampone di lavaggio 2 (BR4) viene fornito come concentrato. Per ottenere una soluzione di lavoro, al primo utilizzo aggiungere 4 volumi di etanolo (96-100%,grado di purezza p. a. – per analisi), come indicato sul flacone.
- Se si utilizza il set DNAsi privo di RNAsi per la prima volta, preparare una soluzione stock di DNAsi I. Sciogliere la DNAsi (RNFD; 1500 unità Kunitz) in 550 μl di tampone di risospensione DNAsi (DRB) presente nel kit. Assicurarsi di non disperdere DNAsi I(RNFD) aprendo la fiala. La DNAsi I (RNFD) ricostituita non deve essere miscelata su vortex. La DNAsi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la provetta.

* L'unità Kunitz viene normalmente utilizzata per misurare la DNAsi I. Un'unità Kunitz si definisce come la quantità di DNAsi I, che a 260 nm (A260) provoca un aumento dell'assorbanza di 0,001 per minuto e millilitro a 25° C e pH 5,0, utilizzando come substrato DNA altamente polimerizzato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. 33, 349 e 363).

- Dati attualmente disponibili mostrano che la DNAsi I ricostituita (RNFD) si mantiene stabile per 6 settimane se conservata a 2-8°C. Per periodi più lunghi, rimuovere la soluzione concentrata dalla fiala in vetro, suddividerla in aliquote monouso (utilizzare provette per microcentrifuga da 1,5 ml [MCT] presenti nel kit; sono sufficienti per 5 aliquote) e conservarla a –20°C fino a 9 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2–8°C fino a 6 settimane. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.
- Quando si ricostituisce e si aliquota la DNasi I (RNFD), attenersi alle "Note generali par il trattamento dell'RNA" (Appendice A, pagina 56).
- Installare il corretto adattatore per agitatore (incluso nel QIAcube;usare l'adattatore per provette safe-lock da 2 ml, segnati con un "2") e porre la rastrelliera dell'agitatore sopra l'adattatore.
- Controllare il cassette rifuti e se necessario svuotarlo.
- Installare i protocolli se non lo si è già fatto per le corse precedenti. Installare i protocolli "PAXgene Blood RNA Part A" and "PAXgene Blood RNA Part B". Vedere "Installazione dei protocolli sul QIAcube" pag. 32.

Procedura

1. **Chiudere la porta del QIAcube e accendere il QIAcube con il tasto di accensione. (vedi Figura 13, pagina 33).**

   Si sentirà un beep e apparirà lo schermo di partenza. Lo strumento eseguirà automaticamente i test di iniziazione.

2. **Aprire la porta QIAcube e caricare i reagenti e gli attrezzi di plastica necessari nel QIAcube. Vedi "Caricare il QIAcube", pag. 34-41.**

   Per guadagnare tempo si può caricare durante uno o entrambe le successive fasi di centrifugazione da 10 minuti (fasi 3 e 5).

3. **Centrifugare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per 10 minuti a 3000–5000 x *g* usando un rotore basculante.**

   ⓘ Assicurarsi che i campioni di sangue siano stati incubati nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 ore a temperatura ambiente (15–25°C) dopo il prelievo di sangue, per garantire la completa lisi delle cellule ematiche.

   ⓘ Il rotore deve contenere adattatori per provette a fondo arrotondato. Se si utilizzano altri tipi di adattatori le provette possono danneggiarsi durante la centrifugazione.

4. **Rimuovere il sovranatante per decantazione o pipettamento. Aggiungere al pellet 4 ml di acqua priva di RNasi (RNFW) e chiudere la provetta con una nuova chiusura Hemogard.**

Se il sovranatante viene eliminato per decantazione, fare attenzione a non staccare il pellet e asciugare il bordo della provetta con carta assorbente pulita.

5. **Miscelare con il vortex finché il pellet non si scioglie e centrifugare per 10 minuti a 3000–5000 x g utilizzando un rotore bascolante. Rimuovere ed eliminare tutto il sovranatante.**

   Eventuali detriti cellulari che rimangono nel sovranatante dopo la miscelazione con vortex non influenzano la procedura.

   ⓘ La rimozione incompleta del sovranatante inibisce la lisi e diluisce il lisato, compromettendo le condizioni di legame dell'RNA alla membrana PAXgene.

6. **Aggiungere 350 µl di tampone di risospensione (BR1) e miscelare su vortex fino alla completa dissoluzione del pellet.**

7. **Pipettare il campione in una provetta di reazione da 2 ml (PT).**

   ⓘ Usare le provette di reazione da 2ml (PT) incluse nel PAXgene Blood RNA Kit.

8. **Caricare le provette di reazione (PT) aperte contenenti il campione nell'agitatore QIAcube (vedi Figura 15, pag. 36). Le posizioni del campione sono numerate per agevolare il caricamento. Inserire gli innesti per i racks dell'agitatore (inclusi con il QIAcube) negli slots sul bordo di ogni rack dell'agitatore vicina ad ogni provetta di reazione. Questo permette la rilevazione dei campioni durante il controllo del caricamento.**

   ⓘ Assicurarsi che sia installato il corretto adattatore per agitatore (adattatore agitatore, 2 ml, provette safe lock, indicati con un "2", inclusi con il QIAcube).

   ⓘ Se si processano meno di 12 campioni, assicurarsi di caricare il rack dell'agitatore come mostrato in Figura 19, pag. 39. Uno o 11 campioni non possono essere processati.

9. **Chiudere la porta dello strumento QIAcube (vedi Figura 13, pag. 33).**

10. **Selezionare il protocollo "PAXgene Blood RNA Part A" e far partire il protocollo.**

    Seguire le istruzioni date sul touchscreen QIAcube.

ⓘ Assicurarsi che le due parti del programma (parte A e B) siano installate sullo strumento QIAcube (vedi “Installare i protocolli sul QIAcube” pag. 32).

ⓘ Il QIAcube eseguirà i controlli del caricamento dei campioni, dei puntali, degli adattatori del rotore e dei flaconi per reagenti.

11. **Quando é terminato il protocollo “PAXgene Blood RNA Part A”, aprire la porta dello strumento QIAcube (vedi Figura 13, pag. 33). Rimuovere e scartare le colonne PAXgene RNA (PRC) dagli adattatori del rotore e le** provette di reazione **(PT) vuote dall’agitatore.**

    ⓘ Durante la corsa le colonne vengono trasferite dalla posizione 1 (posizione tappo L1) alla posizione 3 dell’adattatore del rotore (tappo posizione L2) tramite lo strumento (vedi Figura 17, pag. 38).

12. **Chiudere i tappi di tutte le provette da microcentrifuga (MCT) da 1,5 ml contenenti l’RNA purificato negli adattatori del rotore (posizione 3, posizione tappo L3, vedi Figura 17, pag. 38). Trasferire le provette da microcentrifuga (MCT) da 1,5 ml sull’adattatore dell’agitatore del QIAcube (vedi Figura 15, pag. 36).**
13. **Chiudere la porta dello strumento QIAcube (vedi Figura 13, pag. 33).**
14. **Selezionare il protocollo “PAXgene Blood RNA Part B” e far partire il protocollo.**

    Seguire le istruzioni fornite sul touchscreen.

    ⓘ Questo programma incuba i campioni a 65°C e denatura l’RNA per applicazioni downstream dell’RNA. Se l’applicazione downstream comprende una fase di denaturazione a caldo non saltare questa fase. Una sufficiente denaturazione dell’RNA é essenziale per ottenere la massima efficacia nelle appplicazioni downstream.

15. **Quando é terminato il programma “PAXgene Blood RNA Part B”, aprire la porta dello strumento QIAcube (vedi Figura 13, pag. 33). Posizionare immediatamente le provette da microcentrifuga (MCT) contenenti l’RNA purificato sul ghiaccio.**

ATTENZIONE	**Superficie calda** L’agitatore può raggiungere temperature superiori a 70°C (158°F). Evitare di toccarlo quando è caldo.

ⓘ Non lasciare l’RNA purificato nel QIAcube. Poichè i campioni non sono raffreddati, l’RNA purificato può essere degradato. Si sconsiglia per

questo la preparazione dei campioni durante la notte senza opportuna sorveglianza.

16. **Se i campioni di RNA non vengono usati immediatamente, conservarli a –20°C o –70°C.**

    Poiché l'RNA rimane denaturato dopo ripetuti congelamenti e scongelamenti, non é necessario ripetere il protocollo di incubazione a caldo ("PAXgene Blood RNA Part B").

    ⓘ Per la quantificazione in tampone Tris, usare la relazione $A_{260} = 1 => 44\ \mu g/ml$. Vedi Appendice B, pag. 56.

17. **Rimuovere la rastrelliera per i flaconi dei reagenti dal piano di lavoro QIAcube (vedi Figura 15, pag. 36) e chiudere tutti i flaconi con i tappi appropriatamente etichettati. IL tampone conservato nei flaconi può essere conservato a temperatura ambiente (15-25°C) per piú di 3 mesi. Rimuovere e scartare i reagenti rimasti nelle provette di reazione (PT) negli slots per provette da microcentrifuga del QIAcube (vedi Figura 15, pag. 36). Rimuovere e scartare gli adattatori del rotore dalla centrifuga (vedi Figura 15, pag. 36). Svuotare il cassetto dei rifiuti del QIAcube (vedi Figura 13, pag. 33). Chiudere la porta dello strumento QIAcube e spegnere lo strumento con il tasto di accensione (vedi Figura 13, pag. 33).**

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per chiarire qualsiasi dubbio che può sorgere durante lo svolgimento del protocollo di estrazione. Gli esperti del supporto tecnica QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda su informazioni e i protocolli manuale e automatico inclusi nel presente manuale o per applicazioni in biologia molecolare (per i recapiti vedere pagina 63 o visitate www.qiagen.com).

	Commenti e suggerimenti
RNA degradato	
Contaminazione da RNasi	ⓘ Fare attenzione a non introdurre Rnasi nei reagenti durante la procedura o durante la manipolazione successiva del campione (vedere anche Appendice A, pagina 56).
Bassa resa di RNA	
a) Meno di 2,5 ml di sangue nella PAXgene Blood RNA (BRT)	ⓘ Ensure that 2.5 ml blood is collected in the PAXgene Blood RNA Tube (BRT; see *PAXgene Blood RNA Tube Product Circular*).
b) Concentrazione di RNA misurata in acqua	ⓘ RNA concentration must be measured in 10 mM Tris·Cl, pH 7.5* for accurate quantification (see Appendix B, page 57).
c) Detriti cellulari trasferiti nella colonna PAXgene RNA (PRC) nella fase 7 del protocollo manuale.	ⓘ Evitare di trasferire particelle di grandi dimensioni mentre si pipetta il sovranatante nel passaggio 7 del protocollo manuale (il trasferimento di detriti di piccole dimensioni non influenza la procedura).
d) Sovranatante non eliminato completamente dopo la fase 3.	ⓘ Assicurarsi di rimuovere completamente il sovranatante. Se il sovranatante viene fatto decantare, rimuovere le gocce dal bordo della provetta (BRT) con carta assorbente. Prendere le necessarie precauzioni per evitare contaminazioni crociate.

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per ulteriori infomrazioni consultare le relative schede di sicurezza dei materiali (MSDS).

	Commenti e suggerimenti
e) Dopo il prelievo il sangue è stato incubato meno di 2 ore nelle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)	ⓘ Dopo il prelievo incubare il sangue nella PAXgene Blood RNA Tube (BRT) per almeno 2 ore.
Basso rapporto A_{260}/A_{280}	
a) RNA diluito in acqua prima di misurarne la purezza*	ⓘ Utilizzare 10 mM Tris·HCl pH 7,5, per diluire l'RNA prima di misurare la purezza (vedere Appendice B pagina 57).
b) Spettrofotometro non azzerato completamente	ⓘ Per azzerare lo spettrofotometro, utilizzare un bianco contenente la stessa proporzione di tampone di eluizione (BR5) e tamponi di diluizione presenti nel campione da misurare. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e ciò può portare ad alti valori di assorbimento di sfondo, se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.
Malfunzionamento dello strumento	
QIAcube non utilizzato correttamente.	Leggere il *QIAcube User Manual* porgendo particolare attenzione alla sezione Risoluzione dei problemi. Assicurarsi che il QIAcube sia in corretta manutenzione come descritto nel *QIAcube User Manual*.

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. BioTechniques **22**, 474.

Appendice A: Note generali per il trattamento dell'RNA

Trattamento dell'RNA

ⓘ Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che generalmente non richiedono cofattori per la loro azione. Poiché le RNasi sono difficili da inattivare e anche minime quantità sono sufficienti a distruggere l'RNA, non utilizzare materiale in plastica o vetro senza aver prima eliminato le possibili contaminazioni da RNasi. Fare molta attenzione a non introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di purificazione. Per creare e mantenere un ambiente privo di RNasi, occorre prendere le seguenti precauzioni durante il pre-trattamento e l'utilizzo di flaconi e soluzioni, monouso e non, mentre si opera con l'RNA.

Raccomandazioni generali per il trattamento

ⓘ Quando si lavora con l'RNA è necessario utilizzare tecniche microbiologiche appropriate. Le mani e le particelle di polvere trasportano batteri e muffe e rappresentano le fonti più comuni di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni di RNA, per evitare la contaminazione da RNasi dovuta alla superficie della pelle o alla polvere delle attrezzature di laboratorio. Cambiare i guanti frequentemente e chiudere le provette subito dopo l'uso. Mantenere l'RNA purificato in ghiaccio mentre si pipettano le aliquote per le applicazioni successive.

protocolli per eliminare la contaminazione da RNasi dalla vetreria e dalle soluzioni sono disponibili nelle guide generali di biologia molecolare, ad es. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Appendice B: Determinazione della concentrazione, resa e purezza dell'RNA totale

Quantificazione dell'RNA

La concentrazione di RNA deve essere determinata misurando l'assorbanza a 260 nm (A_{260}) con uno spettrofotometro. Per garantire la significatività, le letture devono rientrare nel range di linearità dello spettrofotometro. L'assorbanza di 1 unità a 260 nm corrisponde a 44 µg di RNA per ml (A_{260} = 1 => 44 µg/ml). Questa relazione è valida solo per le misurazioni effettuate in 10 mM Tris·Cl* (pH 7,5). Pertanto, se occorre diluire il campione di RNA, è necessario utilizzare Tris·Cl 10 mM. Come illustrato di seguito (vedere "Purezza dell'RNA", pagina 58), il rapporto fra i valori di assorbenza a 260 e 280 nm fornisce una stima della purezza dell'RNA.

Quando si misurano campioni di RNA, assicurarsi che le cuvette siano prive di RNasi. Per azzerare lo spettrofotometro utilizzare il tampone in cui viene diluito l'RNA e assicurarsi di aggiungere un volume di tampone di eluizione (BR5) corrispondente a quello dell'RNA eluito. Il tampone di eluizione (BR5) ha un'alta assorbenza a 220 nm, che può portare ad alti livelli di assorbenza di sfondo se lo spettrofotometro non è azzerato correttamente.

Di seguito à riportato un esempio per il calcolo relativo alla quantificazione dell'RNA:

Volume del campione di RNA = 80 µl

Diluizione = 10 µl di campione di RNA + 140 µl 10 mM Tris·Cl, pH 7.5 (1/15 diluizione)

Misurare l'assorbanza del campione diluito in una cuvetta (priva di RNasi).

A_{260} = 0,3

Concentrazione del campione di RNA = 44 x A_{260} x fattore di diluizione
= 44 x 0.3 x 15
= 198 µg/ml

Resa totale = concentrazione x volume del campione in millilitri
= 198 µg/ml x 0,08 ml
= 15,8 µg RNA

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per ulteriori informazioni consultare le relative schede di sicurezza dei materiali (MSDS).

Purezza dell'RNA

Il rapporto dei valori di assorbanza compresi tra 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) rappresenta una misura per la purezza dell'RNA rispetto ai contaminanti che assorbono nell'UV, come le proteine. Questo rapporto di assorbanza dipende dal valore pH. Un pH relativamente basso genera un rapporto A_{260}/A_{280} relativamente basso e riduce la sensibilità rispetto alle contaminazioni proteiche. Se sono necessari dati precisi e affidabili consigliamo di determinare un rapporto di assorbanza A_{260}/A_{280} in 10 mM di Tris·Cl (pH 7,5) *. L'RNA puro ha un rapporto A_{260}/A_{280} pari a 1,8-2,2. Per azzerare il fotometro utilizzare lo stesso tampone nel quale è diluito l'RNA e aggiungere lo stesso volume di tampone di eluizione (BR5) che corrisponde al volume dell'RNA eluito. Il tampone di eluizione (BR5) assorbe intensamente a 220 nm, e questo può portare ad alti valori di assorbanza di sfondo se lo spettrofotometro non è stato azzerato correttamente.

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. BioTechniques **22**, 474.

Appendice C: Utilizzo delle PAXgene Blood RNA Tubes

ⓘ Le seguenti istruzioni di BD forniscono delle indicazioni per l'uso delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Ulteriori informazioni sull'impiego delle PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) si trovano nella relativa descrizione del prodotto.

Istruzioni per rimuovere la chiusura Hemogard BD

1. **Afferrare la PAXgene Blood RNA Tube (BRT) con una mano, disponendo il pollice sotto la chiusura Hemogard BD (per maggiore stabilità, tenere il braccio su una superficie solida). Con l'altra mano ruotare la chiusura Hemogard BD e contemporaneamente spingere con il pollice verso l'alto FINCHÉ IL FERMO DELLA PROVETTA NON SI ALLENTA.**
2. **Allontanare il pollice prima di sollevare la chiusura. NON utilizzare il pollice per rimuovere la chiusura dalla provetta (BRT). Attenzione: Se la provetta (BRT) contiene sangue, esiste un rischio di infezione. Per evitare lesioni durante la rimozione della chiusura, è importante che il pollice utilizzato per spingerla verso l'alto non venga in contatto con la provetta quando la chiusura Hemogard BD viene allentata.**
3. **Sollevare la chiusura della provetta (BRT). Se, come accade di rado, la schermatura in plastica si separa dal fermo in gomma NON RIASSEMBLARE LA CHIUSURA. Rimuovere con cautela il fermo in gomma dalla provetta (BRT).**

Istruzioni per inserire la chiusura secondaria Hemogard BD

1. **Posizionare la chiusura secondaria sulla provetta (BRT).**
2. **Ruotare e spingere verso il basso con decisione, finché non si blocca in posizione.Il reinserimento completo del fermo è necessario affinché la chiusura rimanga bloccata in posizione sulla provetta durante la manipolazione.**

Informazioni per l'ordine

Prodotto	Contenuti	Cat. n.
Sistema PAXgene Blood RNA System		
Prodotti che possono essere ordinati presso QIAGEN		
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 spin columns PAXgene RNA, colonne PAXgene Shredder, provette di reazione, DNAsi I priva di RNAsi, Reagenti e tamponi privi di RNAsi. Da utilizzare con le PAXgene Blood RNA Tubes	762174
QIAcube (110 V)* QIAcube (230 V)†	Stazione di lavoro per la purificazione automatica del DNA, dell'RNA o delle proteine usando i kit di colonne QIAGEN, 1 anno di garanzia sulle parti e sul laboratorio‡	9001292* 9001293†
Garanzia PLUS 2 Full, QIAcube	3 anni di garanzia, 48 ore (2 giorni lavorativi) di risposta prioritaria, tutto il laboratorio, viaggio e riparazioni delle parti.	9240834
Starter Pack, QIAcube	La confezione include: racks per i flaconi per reagenti (3), etichette per i racks (8), puntali per filtro da 200 µl (1024), puntali per filtro da 1000 µl (1024), puntali per filtro da 1000 µl, wide bore (1024); flaconi per reagenti da 30 ml (18); adattatori per rotore (240); supporti per adattatori per rotore	990395
Puntali per filtro, 1000 µl (1024)	Sterili, monouso in rack;	990352
Flaconi per reagenti, 30 ml (6)	Flaconi per reagenti (30 ml) con tappi; confezione da 6; per l'uso con il rack dei flaconi per reagenti QIAcube	990393

* USA, Canada e Giappone.

† Resto del mondo.

‡ Questi accessori per la raccolta del sangue rappresentano tipici prodotti che possono essere usati con le PAXgene Blood RNA Tubes. Per saperne di più, visitare www.bd.com/vacutainer/products/venous .

Prodotto	Contenuto	Cat. n.
Adattatori per rotore (10 x 24)	Per 240 preparazioni: 240 adattatori per rotore monouso; per uso con il QIAcube.	990394
Rack per flaconi per reagenti	Rack per flaconi per reagenti da 6 x 30 ml sul tavolo di lavoro QIAcube	990390
Supporto per adattatori di rotore	Supporto per 12 adattatori di rotore monouso, per l'uso con il QIAcube.	990392
Prodotti che si possono ordinare presso BD* e i rivenditori autorizzati BD‡		
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 provette per il prelievo Da utilizzare con il PAXgene Blood RNA Kit (50)	762165
Set prelievo sangue	BD Vacutainer® Safety-Lok™ Set prelievo sangue: cannula da 0,75 pollici (21 G), tubo da 12 pollici con adattatore luer; 50 in ogni scatola, 200 in ogni confezione	367286
Supporto monouso BD Vacutainer	Contenitore solo per diametro di 13 mm e 16 mm;1000 in ogni confezione	364815
Provette BD Vacutainer Plus Serum	13 x 75 mm, per prelievo da 4,0 ml, con chiusura di sicurezza BD Hemogard rossa e con etichetta in carta; 100 in ogni scatola, 1000 per ogni confezione.	368975

PreAnalytiX nel mondo

I prodotti PreAnalitiX sono distribuiti dalle aziende QIAGEN e BD

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 021-51345678 ■ Fax 021-51342500 ■ Technical 021-51345678

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-920 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 02-33430411 ■ Fax 02-33430426 ■ Technical 800 787980

Japan ■ Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

www.qiagen.com www.PreAnalytiX.com

Australia • BD • North Ryde • Orders 612-8875-7000 • Fax 612-8875-7000

Belgium • BD Erembodegem • Orders 32-53-720-408 • Fax 32-53-720-558

Canada • BD • Oakville • Orders 800-268-5430 • Fax 800-565-0897

Poland • BD • Warsaw • Orders 48-22-651-75-88 • Fax 48-22-651-75-89

USA • BD Diagnostics — Preanalytical Systems • 1 Becton Drive • Franklin Lakes • NJ 07417
Orders 888-237-2762 • Fax 800-847-2220 • Technical support 800-631-0174

www.bd.com www.PreAnalytiX.com